

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,
G. RAMON,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : A. BOQUET.

TOME SOIXANTE-SIXIÈME

Janvier-Juin 1941

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

PARIS. — ANC^{re} IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1941.

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES ET VACCINANTES DE BACILLES ACIDO-RÉSISTANTS DE TYPE S (LISSE) ISOLÉS DU SANG AU COURS DE L'INFECTION TUBERCULEUSE ÉVOLUTIVE CHEZ DE JEUNES SUJETS

par P.-F. ARMAND-DELILLE et M^{lle} O. GYSIN.

*(Institut Pasteur,
Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)*

Les travaux de ces dernières années, grâce à l'hémoculture sur milieux électifs, ont permis d'isoler de nouvelles souches de bacilles acido-résistants. L'étude de leurs caractères et de leurs propriétés nous amène à modifier à un certain degré la conception peut-être trop schématique que nous nous faisons des Bacilles tuberculeux, et à considérer leur rôle sous des aspects infiniment plus complexes.

Il nous a paru intéressant d'étudier les propriétés de quelques-unes de ces races *nettement apparentées au bacille décrit par Koch, malgré certaines notables différences*. Ce sont les résultats de nos recherches qui font l'objet de ce mémoire.

Le point de départ des nouvelles découvertes est la constatation, faite par Petroff en 1929, de la possibilité de dissocier,

dans certaines cultures de bacilles tuberculeux sur milieu électif, des colonies de différents types. Ce fait, déjà observé pour d'autres espèces microbiennes, conduit à envisager d'une autre manière les aptitudes biologiques de cette espèce bactérienne. La dissociabilité des cultures de bacille humain ou bovin, et même aviaire, a été confirmée par de nombreux auteurs, entre autres A. Boquet, L. Nègre, J. Valtis, van Deinse, K. Birkhaug, A. Saenz et L. Costil, R. Laporte, Bruno Besta, Max Pinner, L. Nègre et J. Bretey, pour ne citer que les principaux travaux.

Actuellement, en simplifiant les premières descriptions de Petroff, la plupart des bactériologistes s'accordent à décrire trois principaux types de colonies tuberculeuses, à savoir : 1° le type R (*rough* = rugueux), constitué par des colonies sèches, irrégulières, rugueuses, en petits grains rocheux, plus ou moins conglomérés (c'est la forme qui correspond à la description classique) ; 2° le type S (*smooth* = lisse), constitué par des colonies aplaties, lisses, d'aspect crémeux ; 3° enfin le type Ch (chromogène), composé également de colonies lisses, mais moins régulières, qui se pigmentent rapidement pour prendre une coloration jaune orange. Cette dissociation s'obtient plus ou moins facilement, suivant l'origine de la race bacillaire. Rappelons que, tandis que le bacille humain donne habituellement des colonies rugueuses, en amas irréguliers, les bacilles bovin et aviaire donnent, au contraire, toujours des colonies lisses, dont se dissocient plus ou moins tardivement des colonies du type R. Sans pouvoir énumérer ni citer tous les travaux déjà nombreux consacrés à cette question, rappelons que c'est principalement en partant de colonies obtenues par ensemencement sur milieux à l'œuf (milieu de Petroff et, mieux, milieux de Lœwenstein, de Petagnani, avec les modifications apportées par Saenz) que l'on obtient le plus facilement cette dissociation.

Dans un certain nombre de cas, on l'a réalisée simplement en réensemencant des cultures diluées ; dans d'autres, les formes S n'ont été obtenues que par culture du sang de cobayes préalablement inoculés avec des cultures mères, en employant de préférence la méthode des inoculations intra-ganglionnaires de Ninni.

Si tous les auteurs sont d'accord sur la possibilité de dissociation en trois types, leurs opinions sont diamétralement opposées en ce qui a trait à la virulence respective des différentes souches. Alors que Petroff affirme que les colonies R sont peu virulentes, tandis que les colonies S sont virulentes, Birkhaug, Max Pinner, Nègre et nous-mêmes avons constaté, sur des échantillons respectivement isolés, que, tandis que les colonies R sont virulentes, les colonies de type S sont dépourvues de virulence.

On a objecté à Birkhaug que les colonies S qu'il avait obtenues, d'ailleurs en grande abondance, en partant des cultures de la souche Bovine Vallée de l'Institut Pasteur, ainsi que de deux cultures humaines entretenues à l'Institut Pasteur, ne l'avaient pas été par réensemencement direct, mais par hémoculture du cobaye inoculé, et que si les colonies R étaient virulentes, c'étaient les seules qui dériveraient directement de la race bacillaire inoculée, tandis que les colonies S étaient des bacilles acido-résistants saprophytes chez les cobayes stabulés depuis longtemps. On admettait cependant que ces variétés différaient des paratuberculeux déjà isolés par différents chercheurs, en particulier par Lydia Rabinowitsch, de la fléole, du beurre et d'autres origines non pathologiques. En effet, Saenz a montré que par hémoculture sur Lœwenstein, on pouvait isoler du sang de cobayes neufs (mais ayant séjourné longtemps dans les mêmes locaux que des cobayes tuberculeux et présentant, à un moment donné, des réactions allergiques à la tuberculine), des bacilles donnant des cultures de type S. Sur 21 souches isolées par lui, 7 se sont avérées du *type aviaire*, mais 14 ne présentaient pas les caractères de virulence, pour les poules et les lapins, qui sont le propre de cette variété. Saenz les a décrites comme une variété nouvelle d'acido-résistants.

Les ensemencements, pratiqués par nous, de BCG sur milieu de Lœwenstein ne nous ont jamais fourni de colonies S mais seulement des colonies R, dysgoniques comme le B. bovin.

Max Pinner a isolé des bacilles type S directement du sang, de l'urine et des crachats de sujets atteints de tuberculose pulmonaire ou génito-urinaire. Mais tout en insistant sur leur analogie avec le bacille tuberculeux et la possibilité de les

rendre virulents par des passages successifs, il ne se prononce pas sur leur parenté exacte avec les bacilles tuberculeux typiques.

Pour notre part, simultanément à ces auteurs, et avant la publication de leurs travaux, nous avons obtenu deux races de type S au cours d'une série de recherches sur la valeur de la méthode de Lœwenstein pour la détection du bacille dans le sang circulant, que nous pratiquions chez des enfants atteints de tuberculose pulmonaire évolutive. Ce n'est que deux fois sur 22 cas que nous avons pu obtenir des cultures positives ; les colonies étaient dans 1 cas mélangées R et S, dans l'autre elles se sont présentées d'emblée exclusivement avec les caractères des formes S.

Dans le premier cas, il s'agissait d'un enfant atteint de tuberculose pulmonaire, avec des réactions fébriles qui ont été suivies de décès au bout de peu de temps ; la présence dans les poumons d'abondants nodules tuberculeux a été contrôlée à l'autopsie. L'hémoculture par la méthode de Lœwenstein donna, au bout de trois semaines, des microcultures abondantes, dont le raclage fournissait de nombreux bacilles disposés en panaches incurvés, acido-résistants et colorables par la méthode de Ziehl. Le repiquage sur milieu à l'œuf de Lœwenstein et sur pomme de terre donna des colonies abondantes et confluentes, présentant le caractère eugonique et presque toutes l'aspect rugueux typique. Mais sur milieu de Sauton, nous fûmes frappés de l'apparition dans le liquide, au huitième jour, d'un louche qui alla en s'épaississant les jours suivants, et qui était dû à la culture homogène des bacilles acido-résistants, s'accompagnant de l'apparition d'un voile mince vers le douzième jour. Ce voile s'épaissit légèrement, puis se ride et commence à monter sur les parois du vase vers le vingtième jour. Le réensemencement donna de nombreuses colonies S accompagnées d'une proportion importante de colonies R.

Notre deuxième souche provient également d'une hémoculture pratiquée chez un jeune enfant atteint d'une tuberculose pulmonaire disséminée, à marche envahissante, ayant déterminé la mort au bout de quelques mois. L'autopsie a confirmé l'extension des lésions nodulaires caséuses à toute l'étendue

des deux poumons. Sur un des tubes ensemencés avec le sédiment, nous avons obtenu une colonie bosselée, assez saillante, d'aspect humide, irrégulière et ridée, composée de bacilles acido-résistants qui, au repiquage sur milieux solides et liquides, donna naissance à des colonies présentant toutes le type S.

En ce qui concerne la première souche, les colonies R se manifestèrent de virulence moyenne, tuant le cobaye en trois mois après injection sous-cutanée de 1/10 de milligramme. Les colonies S se montrèrent au contraire avirulentes, incapables de provoquer des lésions généralisées, ne produisant au point d'inoculation qu'un nodule caséeux, d'un volume en rapport avec la dose injectée.

Pour notre deuxième souche, les colonies S obtenues d'emblée avirulentes ne provoquèrent que des lésions caséuses locales, proportionnelles à la dose injectée, et sans généralisation.

Ce sont les souches S de ces deux origines, dont nous avons particulièrement étudié les caractères pathogènes et vaccinaux, qui font l'objet du présent mémoire.

Nous décrirons, dans un autre travail, les caractères morphologiques, culturels et biologiques de ces deux souches de bacilles acido-résistants type S, que nous avons étudiées en détail, en les comparant avec d'autres souches S de différentes origines. Nous ne ferons que signaler ici les plus distinctifs, pour exposer principalement leurs propriétés pathogènes et vaccinales.

Les deux souches que nous avons isolées et étudiées présentent les caractères généraux des types décrits sous le nom de *smooth* — ou S — c'est-à-dire donnant naissance, sur les milieux à l'œuf, à des colonies circulaires, qui atteignent, au bout de trois semaines, une étendue de plusieurs millimètres, et restent aplaties ; elles sont lisses, d'aspect crémeux, comme celles du bacille aviaire dont elles diffèrent cependant par l'absence de pouvoir pathogène pour la poule et le lapin.

Ces colonies, sur milieu à l'œuf, commencent à apparaître au bout d'une semaine, sous forme de petites taches saillantes, d'un blanc crémeux, de consistance visqueuse ; elles s'étalent progressivement pendant trois semaines. A ce

moment, lorsqu'elles ont atteint un diamètre de 5 à 6 millimètres, la partie centrale commence à se rider ; néanmoins la colonie continue à s'étendre et peut même grimper sur la paroi du tube si le milieu est resté suffisamment humide sous capsule paraffinée, tandis qu'il se produit, dans la zone avoisinante, une décoloration du vert brillant, qui est remplacé par un virage du milieu au blanc jaunâtre.

Sur pomme de terre glycinée, on voit apparaître, entre le dixième et le douzième jour, un enduit d'abord laiteux, puis crémeux, qui commence à s'épaissir au bout de la troisième semaine, en conservant son aspect humide et visqueux. Si la culture gagne le bouillon sous-jacent, elle y donne naissance à un voile léger, un peu ridé, tandis qu'une culture homogène plus ou moins abondante se développe dans le liquide.

Sur milieu synthétique de Sauton, il se produit dès le cinquième jour un louche donnant des ondes moirées. Ce louche s'épaissit progressivement, tandis qu'à partir du quinzième au dix-huitième jour, un voile mince et friable apparaît à la surface.

Sur bouillon glyciné ordinaire, la souche se développe de préférence en voile et le bouillon ne se trouble pas ou très peu, temporairement.

Sur gélose ordinaire, la culture est presque nulle. On voit apparaître au bout de quatre semaines de petites colonies blanchâtres qui ne présentent aucune extension.

Les colonies sur milieu à l'œuf ne poussent bien qu'à 37°-38° ; au-dessous de 25°, elles cessent de proliférer.

Qu'ils proviennent de cultures sur gélose à l'œuf, sur pomme de terre glycinée, sur milieu de Sauton, les bacilles se présentent, comme dimensions et caractères de coloration, avec l'aspect de bacilles de Koch ; ils sont nettement allongés, n'ont pas l'aspect court des races décrites par Saenz. Ils prennent la coloration de Ziehl, mais ne présentent pas de granulations dans les cultures jeunes ; celles-ci n'apparaissent que dans les cultures de plus de trois semaines ; au contraire, au début on trouve un certain nombre de formes cyanophiles, qui ne gardent pas le Ziehl et se recolorent par le bleu de méthylène.

Comme nous le dirons dans un travail qui paraîtra prochainement, ces bacilles présentent la même résistance que le bacille tuberculeux à la solution d'acide sulfurique à 15 p. 100. Après un contact de quinze minutes, l'ensemencement donne des colonies abondantes, ce qui explique qu'on puisse les obtenir par culture du sang suivant la technique de Lœwenstein.

*
* *

Nous avons principalement étudié, pour ces souches, le pouvoir allergisant, le pouvoir antigène, la réaction de fixation et le pouvoir pathogène.

POUVOIR ALLERGISANT. — Pour établir leur parenté avec le bacille tuberculeux, nous avons cherché à voir si ces bacilles produisaient de la tuberculine. Des bouillons de culture sur milieu de Sauton, devenus troubles et recouverts d'un voile abondant et plissé, ont été filtrés sur papier et concentrés par le même procédé que ceux qui servent à préparer la tuberculine. Les manipulations ont été faites au laboratoire même de l'Institut Pasteur qui prépare la tuberculine, et les opérations ont été poursuivies simultanément. Avec les bouillons concentrés de chacune de nos deux souches, nous avons pratiqué des cuti-réactions sur une série d'enfants, les uns tuberculeux et présentant une cuti-réaction positive, les autres indemnes et présentant une cuti-réaction négative; nous avons, de plus, pratiqué des intradermo-réactions. Toutes ces réactions ont été faites sur un bras, en même temps qu'à l'autre bras, des réactions témoins faites au moyen de la tuberculine brute I. P. pour la cuti-réaction, et diluée au 1/1.000 (I. P.) pour l'intradermo-réaction. Les réactions ont été absolument parallèles, de même signe, soit positives, soit négatives. Chez certains sujets, les réactions au bouillon concentré se sont montrées, soit égales, en général plus fortes, soit quelquefois légèrement moins fortes que celles provoquées par la tuberculine brute. Elles ont évolué de la même manière et se sont effacées au même moment, après environ huit jours.

POUVOIR ANTIGÈNE. — D'autre part, les cobayes inoculés avec ces souches réagissent à la tuberculine dès la troisième

semaine, et Schaefer a constaté que l'inoculation d'une de nos souches au cobaye, ensuite à la dose de 1 milligramme, les sensibilisait légèrement à la tuberculine. Chez les animaux ayant reçu 10 milligrammes, l'intradermoréaction devient positive à la troisième semaine, et très forte à la sixième semaine.

RÉACTION DE FIXATION. — Les propriétés de nos deux souches ont été étudiées par M. Schaefer comparativement avec celles de bacilles tuberculeux aviaires et de bacilles analogues. Nous tenons à le remercier d'avoir bien voulu nous aider de sa compétence et de son autorité toute particulière sur ce sujet. Il a étudié leur pouvoir fixateur de l'alexine et leur pouvoir absorbant à l'égard des anticorps de différents antisérums. Il les range dans un groupe IV, différent par ses propriétés des groupes I et II qui sont les aviaires vrais, virulents, et du type III qui est celui des bacilles acido-résistants, parasite du cobaye neuf, isolé par Saenz et dont nous avons parlé plus haut. Rappelons que ces quatre types se différencient nettement des saprophytes acido-résistants par le fait qu'ils ont les mêmes exigences que les bacilles tuberculeux des animaux à sang chaud et demandent la présence de glycérine comme source de carbone.

POUVOIR PATHOGÈNE. — Nous l'avons étudié pour l'une de nos souches, sur le cobaye, le lapin, la poule et le singe. A cause de la difficulté de se procurer des singes en grand nombre, nous avons, en ce qui concerne la deuxième souche, limité nos investigations au cobaye, au lapin et à la poule.

Disons immédiatement que nos inoculations à la poule et au lapin ont permis de reconnaître qu'il ne s'agissait pas d'un bacille aviaire, comme nos premiers résultats auraient pu nous amener à le penser.

En effet, des cultures de ce bacille, mises en suspension dans l'eau physiologique, et injectées dans la veine de la poule, à la dose de 1 milligramme, sont restées entièrement sans résultat. Les gallinacés ont survécu sans aucune manifestation et, sacrifiés après cinq et six mois, ils ne présentaient, dans aucun de leurs organes, foie, rate, rein, poumon, aucune lésion de tuberculose aviaire ni aucune autre lésion

pathologique. De même les lapins ayant reçu une injection intraveineuse de 1 milligramme de culture sur pomme de terre âgée de trois semaines, non seulement ont conservé un état excellent, mais ont augmenté de poids. Sacrifiés après une période de trois à six mois, ils ne présentaient en aucun organe, aucune lésion tuberculeuse visible. Les ganglions lymphatiques ainsi que les poumons, le foie et la rate ont leurs dimensions et poids normaux.

Chez le *cobaye*, l'inoculation sous-cutanée de 1/10 de milligramme ne provoque aucune réaction, ni générale, ni locale.

L'inoculation sous-cutanée de 1 milligramme provoque, au bout d'une quinzaine de jours, la formation d'un nodule localisé de la dimension d'une lentille ou d'un petit pois. Ce nodule persiste dans le même état pendant plusieurs mois. Il peut présenter un certain degré de ramollissement, mais il ne s'ouvre pas au dehors et il ne se produit pas de fistulisation. Le plus souvent, il devient fibreux d'emblée et commence à diminuer de volume au bout de quatre à six mois pour se résorber ensuite progressivement. Cette réaction locale peut s'accompagner d'une légère réaction similaire dans le ganglion correspondant ; l'inoculation à la partie basse du flanc entraîne, en effet, une légère adénopathie inguinale. L'inoculation de 10 milligrammes produit au contraire une réaction locale caractéristique. En effet, dix jours environ après l'inoculation, apparaît un nodule d'abord de dimension lenticulaire et de consistance dure, qui augmente progressivement de volume et atteint, au bout d'un mois à six semaines, la proportion d'une petite cerise ; à ce moment, il se ramollit et devient fluctuant, mais ne se fistulise pas. Une ponction exploratrice permet d'en retirer un liquide crémeux épais, dans lequel on retrouve en quantité abondante des bacilles acido-résistants qui, cultivés sur Lœwenstein, donnent naissance à des cultures caractéristiques. La réaction ganglionnaire reste faible. L'abcès local ainsi constitué persiste pendant cinq à six mois, puis se résorbe progressivement, laissant un nodule sclérosé qui peut durer environ un an. Une femelle inoculée avec la souche II que nous avons pu conserver pendant dix-huit mois, a eu une portée absolument saine (nous dirons plus loin que les petits n'avaient pas

acquis la résistance que nous avons contrôlée chez la mère). Les animaux sacrifiés à divers intervalles, ou morts spontanément par pneumonie de laboratoire, ne présentaient aucune manifestation viscérale.

Nous avons pu pratiquer le contrôle histologique des lésions au laboratoire de M. Bablet, grâce au concours de M^{lle} Françoise Bloch ; il nous a montré que ces animaux ne présentaient aucune lésion tuberculeuse, pas plus histologique que macroscopique. Chez les animaux sacrifiés ou morts d'infection intercurrente dans les premières semaines qui suivent l'inoculation de fortes doses (10 milligrammes), on peut constater une augmentation de volume de la rate, et, au niveau des poumons, quelques îlots de nécrose contenant de rares bacilles acido-résistants ; mais ces manifestations s'effacent au bout de quelque temps, et les animaux sacrifiés plus tardivement présentent des tissus d'aspect macroscopique et microscopique absolument normaux.

De même chez le *singe*, cynocéphale jeune, ce microbe se montre également avirulent, mais il provoque, à partir de la dose de 1 milligramme, un abcès caséeux proportionnellement beaucoup plus marqué que chez le cobaye. Le nodule provoqué par l'injection sous-cutanée de 1 milligramme (sous la peau de la partie latérale du thorax), peut se résorber après quelques mois sans s'abcéder. Par contre, l'injection sous-cutanée de 10 milligrammes détermine l'apparition, au bout de trois ou quatre semaines, d'un abcès fluctuant de la dimension d'un haricot à une amande verte, s'accompagnant d'adénopathie similaire au niveau du creux axillaire. Bien que les cynocéphales présentent presque toujours spontanément des ganglions axillaires volumineux, il y a cependant une réaction nettement appréciable de ceux-ci après la constitution du nodule fluctuant.

Au bout de six semaines à deux mois, l'abcès a augmenté de volume et produit une collection purulente sous la peau, entourée d'une gangue réactionnelle assez mince, de sorte qu'au bout de deux mois, l'abcès se fistulise et évacue son contenu. Si on le prélève préalablement par ponction aseptique, on constate que le pus blanc grisâtre homogène, qui le constitue, contient des bacilles acido-résistants nombreux

et facilement colorables sur les frottis, par la méthode de Ziehl.

L'inoculation intrapulmonaire d'une faible dose chez un cynocéphale [par la technique que nous avons employée pour nos recherches sur les inoculations intrapulmonaires discrètes de bacilles virulents (1)] n'a provoqué aucun symptôme fonctionnel. L'animal fut sacrifié au bout de quatre mois. L'autopsie montra l'intégrité de tous les organes et, en particulier, le poumon droit inoculé était macroscopiquement indemne. A l'examen histologique des coupes pratiquées par M^{lle} Bloch, au niveau de la région inoculée, nous constatons l'hyperplasie de quelques nodules lymphoïdes péribronchiques, un œdème hémorragique attribuable à la mort par chloroforme, une infiltration discrète des cloisons interalvéolaires dans des zones limites, tuméfaction endothéliale avec des nodules épithélioïdes très rares et très petits ; il est impossible de déceler aucun bacille acido-résistant dans ces lésions.

Chez un autre cynocéphale jeune, l'injection intraveineuse de 1 milligramme ne provoque aucune réaction, générale ou locale. L'animal est sacrifié six semaines plus tard. Tous les organes, foie, rate, poumons sont normaux. Il existe de petits ganglions trachéo-bronchiques de coloration violacée.

Chez un petit singe cynomolgus mâle, jeune, pesant environ 4 kilogrammes, l'injection intraveineuse dans la saphène de 40 milligrammes de bacilles en suspension dans 10 cent. cubes d'eau physiologique, n'est d'abord suivie d'aucun signe pathologique, mais au bout de deux mois, l'animal s'amaigrit rapidement et meurt quelques jours plus tard. A l'autopsie on ne trouve aucune lésion tuberculeuse, mais l'ensemencement des organes broyés sur milieu de Lœwenstein donne des colonies abondantes de bacilles S, aussi bien pour les poumons que pour les ganglions trachéo-bronchiques et pour la rate.

(1) Pour éviter un ensemencement le long du trajet de l'aiguille, un mandrin de trocart est préalablement introduit par le 4^e espace intercostal sur la ligne axillaire, en plein parenchyme pulmonaire, à une profondeur de 2 centimètres. Lorsqu'il est en place, on introduit à son intérieur, une aiguille creuse dépassant son extrémité de 2 millimètres. La pointe de l'aiguille a été trempée dans une émulsion de bacilles à 1/10.000 ; puis l'aiguille est retirée du trocart, ensuite le trocart lui-même est retiré séparément.

L'examen histologique des poumons montra des cloisons inter-alvéolaires épaissies par infiltration histio-leucocytaire, de nombreux mononucléaires à cytoplasme acidophile, une sclérose marquée des espaces inter-alvéolaires, et de rares cellules épithélioïdes sans dégénérescence caséreuse et sans bacilles acido-résistants. La rate présentait aussi une sclérose notable avec hyperplasie réticulaire, mais également absence de bacilles acido-résistants sur les coupes.

Nous avons cependant indiqué que le broyage des organes permettait d'obtenir des cultures positives, et nous pouvons en conclure que les bacilles acido-résistants étaient peu nombreux. Il est donc difficile de conclure que l'animal est mort de septicémie. Mais on peut admettre que cette dose très élevée a pu provoquer des phénomènes toxi-infectieux mortels, analogues à ceux que produit la même dose injectée dans le péritoine des cobayes. Le nombre limité de singes dont nous disposions ne nous a pas permis de répéter cette expérience, mais nous avons été amenés à ne pas dépasser la dose de 1 milligramme dans le mode d'immunisation par injections intraveineuses répétées que nous décrirons plus loin.

L'ensemble de nos investigations nous a permis de reconnaître que les bacilles type S étaient dépourvus de virulence générale, même lorsqu'on emploie des doses considérablement plus élevées que dans les conditions habituelles d'infection et que seules les très fortes doses provoquent des réactions locales en partie dues à la masse considérable de microbes injectée.

*
* *

La constatation que nous avons faite de l'absence de virulence de ces souches S de bacilles acido-résistants en même temps que de l'analogie de leurs caractères morphologiques avec les bacilles tuberculeux vrais, nous a amenés à rechercher s'ils ne possédaient pas un pouvoir prémunissant. Les expériences que nous avons entreprises dans ce but ont vérifié l'exactitude de notre hypothèse.

Nous avons cherché à immuniser des animaux par différentes voies et par des procédés différents, en nous adressant,

comme sujets d'expérience, aux espèces les plus sensibles à la tuberculose, non seulement au cobaye, mais principalement au singe, dont les modalités de réaction à l'infection tuberculeuse sont très particulièrement comparables à celles du jeune enfant.

Nos expériences sur le cobaye ont été pratiquées simultanément avec nos deux souches. Mais pour le singe, le nombre relativement limité des sujets mis à notre disposition ne nous a permis d'expérimenter qu'avec une seule de nos souches (que nous désignons sous le nom de T. 20. S).

Les cobayes ont été préparés par des injections sous-cutanées ou par des injections intrapéritonéales. Nous avons constaté que ce dernier mode d'inoculation ne présentait pas d'avantages importants, et qu'au contraire l'inoculation sous-cutanée permettait mieux de suivre l'état de la lésion locale produite par le bacille prémunissant.

Pour le singe, nous avons employé soit la méthode de l'inoculation sous-cutanée, soit la méthode des inoculations intraveineuses répétées de petites doses. Ces deux modes d'immunisation se sont montrés efficaces, sans que nous puissions établir une échelle du degré de vaccination en rapport avec la voie d'introduction employée ; nous avons cependant constaté la solidité de la vaccination par injections intraveineuses répétées.

*
* *

Différents lots de cobayes ont été préparés par une injection sous-cutanée de 1 milligramme et de 10 milligrammes. Cette dernière dose provoque seule, d'une manière certaine, un abcès local caséeux persistant pendant plus de six mois.

Nos animaux ont en général été éprouvés, après trois mois, par une injection sous-cutanée de 1/100 de milligramme de tuberculose humaine virulente tuant les témoins entre soixante et quatre-vingt-dix jours.

Or, parmi ces animaux, nous avons constaté que, non seulement les animaux préparés survivaient longtemps aux témoins, mais que si on les sacrifiait de quatre à six mois après l'inoculation virulente, certains d'entre eux ne présentaient aucune lésion tuberculeuse, d'autres étaient à peine touchés. C'est ainsi qu'un animal sacrifié cinq mois et demi

après l'inoculation pathogène, ne présentait pas de lésion locale au point d'inoculation, pas de ganglions sous-lombaires, des poumons normaux avec un petit ganglion trachéal, un foie normal, et que c'est uniquement dans la rate, hypertrophiée, qu'on trouvait 8 gros tubercules grisâtres ; les frottis montrent la présence de rares bacilles acido-résistants ; la culture de la rate broyée, sur milieu de Lœwenstein, décèle également l'existence de bacilles tuberculeux qui poussent en colonies eugoniques typiques. L'augmentation de résistance, très nette et très considérable, n'empêche cependant pas la persistance et la prolifération d'un petit nombre de bacilles.

Le pouvoir prémunissant présente une efficacité à peu près semblable, pour le cobaye, dans les deux souches que nous avons étudiées.

Ce fait nous a permis de nous limiter à l'étude d'une de nos souches seulement, en ce qui concerne le singe, étant donné la rareté de ces animaux.

Pour la même raison, nous n'avons pu les immuniser qu'individuellement, et poursuivre nos expériences sur un petit nombre d'individus à la fois.

Pour étudier la valeur prémunissante des souches S sur le singe, le premier point de comparaison était de contrôler l'extrême sensibilité de cet animal à une injection de bacilles tuberculeux virulents.

Nous l'avons étudiée chez le *Cynomolgus* et le *cynocéphale*.

Une injection sous-cutanée de 1/10.000 (un dixième de milligramme d'une culture de trois semaines d'une souche humaine classique [Tub. Ratti de l'Institut Pasteur]) tue le cynomolgus en deux mois avec formation d'un abcès caséux local, adénopathie similaire et tuberculose miliaire généralisée avec granulations dans tous les organes.

Une injection intraveineuse de 1/100.000 (un centième de milligramme) tue le cynocéphale jeune en six semaines avec tuberculose miliaire généralisée.

Une injection intrapulmonaire de 1/10.000 de milligramme tue le cynocéphale jeune et adulte en soixante à soixante-dix jours, avec énorme foyer de primo-infection caséuse dans le poumon, énorme adénopathie trachéo-bronchique et tuberculose miliaire généralisée à tous les organes. Si le trajet de l'aiguille a entraîné des bacilles au moment de l'injection intrapulmonaire, on note, en plus, une tuberculose caséuse primitive de la plèvre, sans épanchement.

Ceci établi, et vérifié sur des témoins employés à différentes reprises quand nos lots d'animaux étaient suffisants, nous avons préparé, en plusieurs séries successives, 2 ou 3 animaux à la fois par des injections sous-cutanées ou intraveineuses de notre souche S n° 1 (dite T. 20. S). Rappelons que nous avons dû nous limiter, actuellement, et faute de matériel singe en quantité suffisante, à l'étude d'une seule souche. Nous n'avons pas noté de différence de résistance très notable suivant la voie de prémunition employée, sous-cutanée ou intraveineuse. Cependant, nous croyons légitime de considérer que, ainsi que l'ont signalé Nègre et Bretex, la résistance conférée serait encore plus marquée à la suite d'injections intraveineuses répétées de bacilles préparants S.

Voici quelques exemples de nos expériences, dont les résultats ont déjà été communiqués antérieurement à la Société de Biologie et à l'Académie des Sciences.

Première série : Un *Cynomolgus* femelle reçoit une injection préparante de 10 milligrammes de culture sur pomme de terre de bacille lisse (T. 20. S) le 14 novembre 1934, qui provoque la formation d'un abcès local à pus caséux, avec légère adénopathie. Cet abcès local se résorbe au bout de trois mois.

Le 29 mai 1935, il reçoit sous la peau, en même temps qu'un témoin, une injection hypodermique de 1/10.000 de milligramme de culture de trois semaines sur pomme de terre de tuberculose Ratti I. P. Vers le milieu de juillet, on constate un petit nodule induré au point d'inoculation avec un ganglion axillaire de faible proportion.

Tandis que le témoin meurt le 2 août, l'animal prémuni reste en parfaite santé. Le 18 décembre 1935, c'est-à-dire sept mois après l'inoculation d'épreuve, il est absolument normal et conserve seulement, au point d'inoculation, un nodule du volume d'une petite cerise, accompagné d'un petit ganglion axillaire. A cette date, il est sacrifié par injection intrarachidienne sous-occipitale de 2 cent. cubes de chloroforme.

A l'autopsie, on constate au point d'inoculation un abcès à contour caséux, dont le pus présente sur frottis des bacilles acido-résistants, mais il n'existe aucune tuberculose viscérale ni même des ganglions trachéo-bronchiques.

*
* *

Quatrième série : 2 cynocéphales mâles, jeunes, neufs, contrôlés par l'étude de la déviation du complément qui est négative en présence d'antigène méthylique, reçoivent 4 injections successives de T. 20 S de culture de trois semaines sur Lœwenstein de pomme de terre, aux taux et dates suivants :

30 juin 1937 : 1/10 de milligramme ;

27 août : 1 milligramme ;
22 septembre : 1 milligramme ;
23 novembre : 1 milligramme.

Ces animaux se maintiennent en parfaite santé.

Le 12 janvier 1938, injection d'épreuve d'une souche virulente (tub. humaine Carnera de Saenz) en injection intrapulmonaire dans le lobe supérieur du poumon droit : l'un, cage 3 — une pointe de fil d'argent ; l'autre, cage 6, 1/100.000 de milligramme.

Alors qu'une grosse femelle adulte témoin, inoculée par voie sous-cutanée de 1/10.000 de milligramme meurt en quatre mois avec tuberculose ganglionnaire et généralisations, les 2 animaux préparés conservent une parfaite santé.

En octobre, neuf mois après, une épidémie de pneumonie s'étant déclarée dans la singerie, ils meurent l'un le 11 octobre, l'autre le 18 octobre 1938.

L'animal qui a reçu une dose minime (mais mortelle en moins de trois mois pour le cynocéphale jeune neuf) présente uniquement un complexe primaire circonscrit, sous forme d'un nodule tuberculeux cru, non caséifié, avec organisation fibreuse périphérique dans le poumon inoculé, et le ganglion trachéo-bronchique correspondant tuméfié et du volume d'une noisette, sans tuberculose des autres organes.

L'autre présente au point d'inoculation, dans le lobe supérieur du poumon droit, un nodule caséeux du volume d'une cerise, avec un ganglion trachéo-bronchique cru en voie de caséification. Il existe, de plus, sur le trajet de l'aiguille, une infiltration thoracique fibro-caséuse au-dessous de la plèvre pariétale, mais pas de lésions viscérales ni de généralisation miliaire.

*
* *

Nous avons répété ces expériences à plusieurs reprises. Les infections de singerie, si fréquentes, nous ont donné l'occasion de contrôler l'évolution des lésions.

Par exemple, un cynocéphale jeune, contrôlé comme neuf par réaction de déviation du complément, et préparé seulement par une injection intraveineuse de 1/10 de milligramme de souche S (T. 20 S) le 23 novembre, puis de 1 milligramme le 21 décembre 1938, reçoit une inoculation d'épreuve de 1/100.000 de milligramme le 13 février 1939, sous la peau. Il meurt de pneumonie épidémique le 29 mars. On ne trouve au point d'inoculation qu'une infiltration réactionnelle non caséifiée. Le ganglion axillaire a légèrement réagi. L'examen histologique de ce ganglion, pratiqué par M^{lle} Françoise Bloch, montre une prolifération réticulo-fibrocytaire et des plages nécrotiques avec aspect épithélioïde, mais sans bacilles décelables sur les coupes.

Plus récemment, un cynocéphale préparé par injections sous-cutanées, ayant reçu, six mois auparavant, une injection d'épreuve intrapulmonaire de 1/10.000 de milligramme d'un bacille humain virulent qui a tué tous les cobayes témoins dans les délais normaux, est mort spontanément, mais vraisemblablement par atélectasie pulmonaire due au développement d'un gros ganglion caséeux, sans extension ni généralisation.

Un autre cynocéphale, préparé et inoculé dans les mêmes conditions et à la même date, est mort quelques semaines avant, avec des lésions locales de la plèvre et du poumon à tendance fibro-caséuse. Il présentait cependant quelques granulations disséminées dans l'autre poumon, mais le foie et la rate étaient indemnes.

Le nombre de nos animaux préparés et éprouvés est encore trop peu considérable pour établir des lois rigoureuses quant au taux de la prémunition ; nous avons pu constater cependant, chez les singes comme chez les cobayes, une certaine irrégularité de résistance, due vraisemblablement à des questions individuelles de terrain qui restent encore aussi mystérieuses qu'en ce qui concerne l'organisme humain. Certains singes acquièrent une résistance très marquée, tandis qu'exceptionnellement, on voit mourir plus précocement des animaux qui n'ont présenté qu'une résistance incomplète ; c'est un accident qu'on observe au cours de toutes les vaccinations et de toutes les prémunitions.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Des recherches que nous venons de relater, il résulte qu'il est possible d'isoler directement du sang de sujets tuberculeux évolutifs (nos deux souches proviennent d'enfants atteints de lésions pulmonaires) par hémoculture sur milieu à l'œuf suivant la méthode de Lœwenstein, ainsi que l'a fait en même temps que nous Max Pinner, des bacilles acido-résistants qui présentent tous les caractères de forme, de dimensions et de culture des souches *lisses* de bacilles tuberculeux, tels qu'on les observe dans la tuberculose aviaire et dans la tuberculose bovine.

Ces bacilles, dont nous décrirons dans un autre travail les caractères de culture sur différents milieux, et les réactions chimiques, ont de nombreuses propriétés communes avec les bacilles tuberculeux, à savoir qu'ils confèrent à l'animal l'allergie tuberculinique qui se caractérise par une intradermo-réaction à la tuberculine; et, d'autre part, qu'ils possèdent un pouvoir tuberculinigène, puisque les bouillons de culture concentrés, évaporés dans les mêmes conditions que la tuberculine brute, provoquent des cuti-réactions et des intradermo-réactions parallèles à celle-ci chez les sujets humains allergiques.

Ces bacilles ne sont pas des bacilles aviaires, puisqu'ils ne sont pas virulents ni pour la poule ni pour le lapin et qu'ils s'en différencient également par leurs réactions de fixation. Ces bacilles ont un pouvoir pathogène très atténué, ils ne produisent pas de tuberculose caséuse miliaire ou même ganglionnaire; c'est seulement à très forte dose (10 milligrammes) qu'ils provoquent chez le cobaye des lésions locales sous forme d'un nodule volumineux, se transforment au bout d'un mois en abcès caséux fluctuant, dans le pus duquel on retrouve de nombreux bacilles acido-résistants.

Bien que ne possédant pas de virulence, nous avons observé que ces bacilles ont un pouvoir vaccinant très marqué pour le cobaye et pour le singe. Cette constatation est semblable à celle faite chez ces mêmes animaux par Nègre, Valtis et Bretey, avec des souches de bacilles lisses isolés du sang de cobayes inoculés de produits tuberculeux ou suspects, et traités par l'extrait acétonique.

Tels sont les faits observés. Ils posent des problèmes de pathologie générale et de bactériologie qui nécessitent une discussion attentive. Est-il possible d'en tirer des conclusions sur l'origine exacte de ces bacilles et leur filiation avec les bacilles tuberculeux virulents vrais? La question est encore à l'étude et mérite d'être réservée jusqu'à plus ample information.

Les formes S de bacilles acido-résistants, non pathogènes mais préimmunisantes isolées directement du sang de malades tuberculeux, dérivent-elles directement du bacille tuberculeux vrai, ou constituent-elles une espèce spéciale, mais

voisine, qui, toutes proportions gardées, jouerait vis-à-vis des bacilles virulents le rôle de la vaccine jennérienne vis-à-vis de la variole ?

Au cours des premières études consacrées à certaines de ces races qui avaient été obtenues par hémoculture de cobayes préalablement inoculés de produits tuberculeux, on n'a élevé aucun doute sur leur filiation directe avec le bacille tuberculeux.

Rappelons brièvement que Birkhaug, qui obtient de deux souches humaines, par hémoculture du cobaye inoculé, de nombreuses colonies de bacilles type S mélangées au type R, considère qu'il y a une filiation directe du bacille tuberculeux vrai avec les bacilles S. C'est l'opinion également de Nègre, Valtis et Bretey. Par contre, Saenz a montré, dans un mémoire des plus documentés publié dans ces *Annales*, qu'on peut isoler du sang de cobayes neufs, un bacille acido-résistant de type S qui est dépourvu d'action pathogène pour le cobaye, le lapin et la poule.

Max Pinner, comme nous-mêmes, a obtenu, en partant de produits pathologiques cultivés directement sur milieu à l'œuf, des colonies simultanées de type R et de type S. Ces dernières, comme celles que nous avons obtenues, ne se sont pas montrées virulentes, mais il n'a pas recherché leur pouvoir prémunissant, pas plus que la production d'allergène. Par contre, il a obtenu, pour certaines d'entre elles, par passages successifs chez le cobaye, des reprises de virulence.

La question de l'origine et de la filiation de ces bacilles acido-résistants type S reste donc encore fort obscure.

S'agit-il d'un saprophyte qui peut vivre dans l'organisme, soit à l'état isolé, soit simultanément avec le bacille tuberculeux virulent ? S'agit-il, au contraire, de formes de bacilles tuberculeux atténuées dans leur virulence et modifiées dans leurs propriétés biologiques et qui, de ce fait, pourraient circuler dans les vaisseaux sanguins sans y déterminer la formation de tubercules et, par suite, s'y conserveraient à l'état de véritables saprophytes ? La question reste posée. Mais ces bacilles acido-résistants possèdent cependant certains caractères qui les rapprochent très sensiblement des bacilles tuberculeux.

Ainsi que nous l'avons démontré, ils produisent, en culture sur bouillon, un allergène qui possède absolument les mêmes caractères que la tuberculine, et provoque les mêmes réactions en cuti et en injection intradermique.

D'autre part, sur l'animal préparé, ils provoquent non seulement l'apparition d'une réaction tuberculinique (intradermo-réaction positive à la tuberculine), mais ils possèdent un pouvoir prémunissant très net et tout à fait comparable à celui du BCG, puisqu'il retarde et atténue considérablement la tuberculose expérimentale du cobaye, et que chez le singe, il prémunit l'animal contre la forme généralisée et qu'il limite l'infection à des lésions locales.

Alors que le témoin meurt en soixante-dix jours, l'animal inoculé sous la peau avec des bacilles virulents et sacrifié neuf mois après l'inoculation d'épreuve ne présente qu'un nodule local, quelques nodules pleuro-péricardiques isolés, et une réaction ganglionnaire trachéo-bronchique discrète, sans aucune généralisation.

Lorsque, chez les animaux préparés, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intraveineuse, on pratique une inoculation d'épreuve de bacilles tuberculeux virulents, on n'observe, après plusieurs mois, dans les trois quarts des cas, que des lésions localisées au poumon correspondant, caséeuses mais à tendance scléreuse, sans aucune localisation viscérale ni au foie, ni aux poumons. Si parfois on observe des granulations miliaires, elles se voient parfois dans le poumon opposé, vraisemblablement par infection bronchique ; le foie et la rate, sauf rares exceptions, restent indemnes.

Ces souches S, vaccinales pour le cobaye et le singe, engendrant dans le bouillon une substance qui a les propriétés de la tuberculine, et provoquant chez le cobaye l'allergie à la tuberculine, se rapprochent donc par leurs principaux caractères des bacilles tuberculeux classiques.

BIBLIOGRAPHIE

- ARMAND-DELILLE et GAVOIS. *C. R. Soc. de Biol.*, **418**, 1935, p. 1317.
ARMAND-DELILLE et M^{lle} BLOCH. *C. R. Soc. Biol.*, **421**, 1936, p. 651.
ARMAND-DELILLE. *Bull. de l'Acad. de Méd.* 20 décembre 1938, **420**, n° 38, p. 778.

- ARMAND-DELILLE et M^{lle} GYSIN. *C. R. Soc. de Biol.*, **129**, 1938, p. 465.
- ARMAND-DELILLE, J. BABLET et F. BLOCH. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1003.
- BIRKHAUG. *Ces Annales*, **54**, 1935, p. 19, 195.
- BOQUET (A.) et BRETEY. *Ces Annales*, **52**, 1934, p. 252.
- BOQUET (A.) et BROCA (R.). *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 8.
- BRETEY et LAPORTE. *C. R. Soc. Biol.*, **120**, 1935, p. 316.
- COOPER et PETROFF. *Journ. of Infec. Dis.*, **43**, 1928, p. 200.
- GRIFFITH (A. Stanley). *Journ. of path. and bact.*, **33**, 1930, p. 153.
- JENSEN (K. A.) et FRIMODT-MÖLLER (T.). *Acta Tuberc. Scandinavica*, **8**, 1934, p. 153.
- NÈGRE (L.) et BRETEY. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 295.
- NÈGRE (L.) et BRETEY. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, **115**, 1936, p. 341.
- NÈGRE (L.), BRETEY et M^{lle} GERHARDT. *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 649.
- NÈGRE (L.) et BRETEY. *La Presse Médicale*, n° 39, 15 mai 1937.
- NÈGRE (L.) et TROISIER. *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 820.
- NÈGRE (L.) et TROISIER. *La Presse Médicale*, n° 90, 9 novembre 1935.
- NÈGRE, VALTIS et BONNEFOI. *C. R. Soc. de Biol.*, **114**, 1933, p. 1060.
- NÈGRE (L.), VALTIS et LAROCHE (Guy). *C. R. Soc. de Biol.*, **108**, 1931, p. 482.
- NINNI et BRETEY. *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 240.
- NINNI et BRETEY. *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 249.
- MAX PINNER. *American Rev. of Tub.*, octobre 1930.
- SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 300.
- SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 584.
- SAENZ (A.) et COSTIL (L.). *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 518.
- SAENZ (A.), COSTIL (L.) et S DETTIN (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, p. 1175.
- SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN (M.). *Ces Annales*, **57**, 1936, p. 254.
- SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 643.
- SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **118**, 1935, p. 645.
- SAENZ (A.), COSTIL (L.) et SADETTIN (M.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1286.
- SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 169.
- SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 961.
- SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 1086.
- SCHAEFER (W.). *C. R. Soc. de Biol.*, **120**, 1935, p. 590.
- VALTIS et VAN DEINSE. *C. R. Soc. de Biol.*, **119**, 1935, p. 933

SUR L'APPARITION PRÉCOCE DE L'ALLERGIE ET DE LA RÉSISTANCE ANTITUBERCULEUSE CHEZ LES ANIMAUX VACCINÉS PAR LE BCG AU MOYEN DE SCARIFICATIONS CUTANÉES

par L. NÈGRE et J. BRETEY.

(Institut Pasteur.

Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)

S. R. Rosenthal a montré qu'il est possible de rendre les cobayes et les enfants allergiques en introduisant le vaccin BCG dans leur organisme par des piqûres cutanées multiples.

En répétant chez le cobaye les expériences de cet auteur, nous avons constaté l'efficacité de sa méthode au point de vue de la production de l'allergie (ces *Annales*, 64, 1940, p. 189) et nous avons démontré qu'elle provoque la même résistance antituberculeuse que les autres procédés de vaccination par voie parentérale (voies sous-cutanée et intradermique). Nous avons, d'autre part, établi que les scarifications cutanées faites avec un vaccinostyle à travers 1 goutte d'une suspension de BCG déposée sur la peau donnent les mêmes résultats que les piqûres effectuées au moyen d'une aiguille. Cette méthode de vaccination par scarification paraît d'un emploi plus simple que celle par piqûre et présente la même innocuité. Weill-Hallé l'a pratiquée chez l'enfant avec des résultats très favorables.

La méthode de S. R. Rosenthal n'a pas seulement comme avantage sa simplicité d'application et son innocuité. Dès le début de nos recherches, nous avons été frappés, comme cet auteur, par la précocité d'apparition de l'allergie chez les animaux vaccinés par des scarifications ou par des piqûres, puisque environ 50 p. 100 des animaux vaccinés par ces procédés réagissent positivement à la tuberculine vers le huitième jour après leur prémunition.

Nous avons donc pensé qu'il serait intéressant de préciser dans quels délais apparaît et progresse la sensibilité à la tuberculine des animaux vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées et d'apprécier le degré de la résistance anti-tuberculeuse qui l'accompagne dans les premières semaines après la vaccination.

APPARITION DE L'ALLERGIE CHEZ LES COBAYES VACCINÉS PAR LE BCG AU MOYEN DE SCARIFICATIONS CUTANÉES.

Afin d'éliminer les facteurs individuels, nous avons cherché à déterminer les dates d'apparition de l'allergie chez le plus grand nombre possible d'animaux.

Ceux-ci ont été vaccinés par 6 traits de scarifications de 1 centimètre de longueur faites en croix à travers 1 goutte de la suspension de BCG contenant 5 milligrammes de ces germes par centimètre cube. Ils ont été éprouvés à différents intervalles après la vaccination par injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée à 1/20.

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

DÉLAI de l'épreuve après la vaccination	NOMBRE de cobayes	NOMBRE de réactions positives	PROPORTION des animaux qui ont réagi positivement p. 100
—	—	—	—
3 ^e jour	6	0	0
4 ^e -5 ^e jour	20	2	10
6 ^e jour	16	2	12
7 ^e jour	21	10	47
9 ^e jour	15	8	53
12 ^e jour	31	25	80
19 ^e jour	12	11	91
29 ^e jour	15	15	100

On voit dans le tableau précédent que toutes les réactions ont été négatives pendant les trois premiers jours après la vaccination. Mais, dès le quatrième-cinquième jour, 10 p. 100 environ des animaux vaccinés commencent à être sensibles à la tuberculine. Cette proportion s'élève rapidement puisque, vers le septième-huitième jour, près de 50 p. 100 des cobayes réagissent positivement et environ 80 à 90 p. 100 dans la

période comprise entre le douzième et le dix-neuvième jour. Il n'est pas rare d'obtenir 100 p. 100 de réactions positives à la fin du premier mois après la vaccination.

APPARITION DE LA RÉSISTANCE ANTITUBERCULEUSE
CHEZ LES COBAYES VACCINÉS PAR LE BCG
AU MOYEN DE SCARIFICATIONS CUTANÉES.

Pour étudier l'apparition de la résistance antituberculeuse, conférée aux animaux de laboratoire par cette méthode, nous avons vacciné des cobayes de la même façon que dans les expériences précédentes. Après avoir recherché dans quelle proportion ils réagissaient à la tuberculine, ils ont été éprouvés, ainsi que des cobayes témoins, à divers intervalles après leur vaccination, par inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 001 d'une souche de bacilles tuberculeux très virulents d'origine humaine. Les délais qui se sont écoulés entre la prémunition et l'infection ont été de sept, neuf, douze et dix-neuf jours suivant les lots.

Epreuve virulente sept jours après la prémunition.

EXPÉRIENCE. — Le 12 septembre 1939, 18 cobayes sont vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées dans la région de la nuque (6 scarifications en croix de 1 centimètre de longueur à travers 1 goutte de la suspension de BCG contenant 5 milligrammes de ces germes par centimètre cube, préparée le même jour). Le 18 septembre, six jours après leur vaccination, ils sont éprouvés par injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée à 1/20. 2 cobayes seulement réagissent faiblement, soit 12,5 p. 100.

Le lendemain, soit sept jours après leur vaccination, tous ces animaux ainsi que 20 cobayes témoins, reçoivent sous la peau de la cuisse droite 0 milligr. 001 de bacilles tuberculeux très virulents (souche d'origine humaine 239). Ils sont sacrifiés le 7 novembre 1939, soit quarante-neuf jours après l'inoculation virulente. Leurs lésions ganglionnaires inguinales et sous-lombaires ne diffèrent pas sensiblement de celles des cobayes témoins. La plupart d'entre eux ont de nombreux tubercules sur la rate (2 seulement n'ont aucune lésion sur cet organe et 4 quelques tubercules). 30 p. 100 de ces cobayes ont des lésions du foie et 50 p. 100 de nombreux tubercules sur les poumons. Tous les cobayes témoins présentent une grosse rate avec de très nombreux tubercules. Ils sont atteints de lésions du foie et des poumons dans la même proportion que les cobayes vaccinés.

Les cobayes, vaccinés par le BCG au moyen de scarifications

cutanées et éprouvés sept jours après leur prémunition par inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 001 d'un bacille tuberculeux très virulent, se sont comportés comme les cobayes témoins. Au bout de ce délai, leur résistance antituberculeuse s'est donc montrée à peu près nulle.

Epreuve virulente neuf jours après la prémunition.

EXPÉRIENCE. — Le 31 août 1939, 8 cobayes sont vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées dans la région de la nuque (6 scarifications en croix de 1 centimètre de longueur à travers 1 goutte de la suspension de BCG contenant 5 milligrammes de ces germes par centimètre cube, préparée le même jour).

Huit jours après leur vaccination, ces cobayes sont éprouvés par injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée à 1/20. 60 p. 100 d'entre eux réagissent positivement. Deux animaux meurent prématurément. Le 8 septembre, soit neuf jours après leur prémunition, les 6 survivants, ainsi que 6 cobayes témoins, reçoivent sous la peau de la cuisse droite 0 milligr. 001 de bacilles tuberculeux très virulents (souche d'origine humaine 239). Ils sont sacrifiés cinquante-huit jours après cette épreuve. Tous les cobayes vaccinés présentent quelques rares tubercules sur la rate, ils n'ont pas de lésions du foie et des poumons, alors que les cobayes témoins ont leur rate très hypertrophiée avec de très nombreux tubercules ; tous ont des lésions du foie et des poumons.

Dès le neuvième jour après la vaccination, une certaine résistance antituberculeuse paraît s'établir chez les cobayes prémunis par le BCG au moyen de scarifications cutanées.

Sur la rate des animaux vaccinés, les tubercules sont beaucoup moins nombreux que chez les témoins. Ces derniers ont des lésions importantes du foie et des poumons, alors que ces organes sont indemnes chez les cobayes vaccinés.

Epreuve virulente douze jours après la prémunition.

EXPÉRIENCE. — 12 cobayes sont vaccinés par le BCG, le 29 juin 1939, au moyen de scarifications cutanées dans la région de la nuque (6 scarifications en croix de 1 centimètre dans 1 goutte de la suspension de BCG contenant 5 milligrammes de ces germes par centimètre cube, préparée le même jour). Onze jours après leur vaccination, ils sont éprouvés par injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée à 1/20. 60 p. 100 d'entre eux réagissent positivement. Le lendemain (douze jours après leur vaccination), ces cobayes, ainsi que 11 témoins, reçoivent, sous la peau de la cuisse droite, 0 milligr. 001 de bacilles tuberculeux très virulents (souche d'origine humaine 239).

Ils sont sacrifiés le 28 août, soit quarante-huit jours après cette inoculation. Chez les cobayes vaccinés, tous les organes (rate, foie, poumons) sont indemnes de lésions. 2 cobayes seulement ont chacun une petite granulation sur la rate. Les cobayes témoins ont une grosse rate avec de très nombreux tubercules. 50 p. 100 d'entre eux présentent des lésions du foie.

D'après ces résultats, la résistance antituberculeuse des cobayes éprouvés douze jours après leur vaccination est plus prononcée que celle des cobayes éprouvés dans un délai de neuf jours. Tous leurs organes sont presque complètement indemnes de lésions, tandis que chez les cobayes témoins, la rate hypertrophiée présente de très nombreux tubercules et que 50 p. 100 d'entre eux ont des lésions du foie.

Epreuve virulente dix-neuf jours après la prémunition.

EXPÉRIENCE. — Le 30 août 1940, 12 cobayes sont vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées dans la région de la nuque (6 scarifications en croix de 1 centimètre de longueur dans 1 goutte de la suspension de BCG contenant 5 milligrammes de ces germes par centimètre cube, préparée le même jour).

Le 11 septembre, douze jours après la vaccination, ils sont éprouvés par injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée à 1/20. 82 p. 100 d'entre eux réagissent positivement.

Le 18 septembre, soit dix-neuf jours après leur vaccination, ils reçoivent, ainsi que 18 témoins, sous la peau de la cuisse droite 0 milligr. 001 de bacilles tuberculeux très virulents (souche d'origine humaine 239). Tous sont sacrifiés cinquante jours après cette inoculation. Les ganglions sous-lombaires des vaccinés sont de dimensions irrégulières mais en général moins volumineux que ceux des témoins. 10 cobayes n'ont aucune lésion sur leur rate, 2 présentent un ou deux petits tubercules sur cet organe. Les poumons et le foie n'ont aucune lésion. Par contre, chez les témoins, la rate hypertrophiée a un grand nombre de gros tubercules. 30 p. 100 de ces cobayes ont des lésions sur le foie et 60 p. 100 sur les poumons.

La résistance antituberculeuse des cobayes prémunis par le BCG administré par des scarifications cutanées et éprouvés par une inoculation virulente, dix-neuf jours après leur vaccination, s'affirme de plus en plus nette si l'on considère les lésions des témoins.

CONCLUSIONS.

Il ressort de nos expériences qu'environ 10 p. 100 des cobayes vaccinés par des scarifications cutanées imprégnées

de BCG commencent à réagir positivement à la tuberculine vers le quatrième ou cinquième jour après leur vaccination. Cette proportion s'élève très rapidement dans les jours suivants. Elle atteint 50 p. 100 vers le septième-huitième jour et 80 p. 100 le douzième jour. On peut observer 100 p. 100 de réactions positives à la fin du premier mois après la vaccination.

Nous avons également constaté qu'une certaine résistance antituberculeuse commence à se manifester, chez les cobayes vaccinés par le BCG au moyen de scarifications cutanées, dès le neuvième jour après leur prémunition. Cette résistance se renforce progressivement dans les jours suivants et, dès le dix-neuvième jour, elle paraît atteindre un degré semblable à celui que l'on observe au bout de trente à quarante-cinq jours après la vaccination.

Sans préjuger des rapports qui peuvent exister entre l'allergie et l'immunité, il est intéressant de noter que chez les animaux vaccinés par des scarifications cutanées, l'une et l'autre apparaissent précocement et évoluent d'une façon tout à fait parallèle.

La simplicité d'application de cette méthode d'immunisation, son innocuité et sa rapidité d'action doivent en faire un procédé de choix pour la vaccination de l'enfant par le BCG.

BIBLIOGRAPHIE

- ROSENTHAL (S. R.). *Amer. Rev. of Tuberculosis*, **39**, janvier 1939, p. 128 ; Soc. d'études scientifiques de la Tuberculose, 13 mai 1939, in *Revue de la Tuberculose*, 5 juillet 1939, p. 825.
- NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). Soc. d'études scientifiques de la Tuberculose, 13 mai 1939, in *Revue de la Tuberculose*, 5 juillet 1939, p. 824 ; *Bull. Acad. de Méd.*, **121**, 27 juin 1939, p. 886 et **123**, 16 janvier 1940, p. 26 ; *Ces Annales*, **64**, 1940, p. 189.
- WEILL-HALLÉ (B.). Soc. d'études scientifiques de la Tuberculose, 13 mai 1939, in *Revue de la Tuberculose*, 5 juillet 1939, p. 827 ; *Bull. Acad. Méd.*, **121**, 27 juin 1939, p. 890 ; *Paris Médical*, 2-9 décembre 1939, p. 298.

**L'HYPERSENSIBILITÉ A LA TUBERCULINE
ET LA RÉSISTANCE AUX SURINFECTIONS VIRULENTES
PRODUITES
PAR LE BACILLE TUBERCULEUX ATTÉNUÉ R¹**

par ALFRED BOQUET.

*(Institut Pasteur, Laboratoires de recherches
sur la tuberculose.)*

Le bacille dit R₁ a été isolé en 1891 par Trudeau, des poumons d'un enfant mort de granulie (L. U. Gardner). En 1893, sa virulence commença à diminuer spontanément et en 1895, elle était déjà si affaiblie que seules de fortes doses se montraient capables de tuberculiser le cobaye. De 1895 à 1897, un grand nombre d'inoculations de R₁ furent pratiquées sur des singes, des chevaux, des ânes, des moutons et des chèvres : aucune n'aboutit à la production de lésions tuberculeuses extensives.

Depuis, la virulence du bacille R₁, telle qu'elle ressort en particulier des expériences d'A. K. Krause et de H. S. Willis, semble s'être stabilisée à ce degré d'atténuation. La souche dont nous disposons et que nous devons à l'obligeance de H. S. Willis, s'est montrée un peu plus pathogène que le BCG et d'isolement beaucoup plus difficile par la méthode de Löwenstein, à partir des organes infectés. Inoculée par la voie sous-cutanée, à la dose de 1 milligramme à 3 milligrammes, elle provoque encore, chez le cobaye, un abcès local qui ne s'ouvre pas à l'extérieur, mais persiste pendant plusieurs mois en s'accompagnant d'un gonflement très net des ganglions du voisinage et de la chaîne suivante. On n'observe pas de foyers de caséification dans les ganglions hypertrophiés, et l'adénopathie régresse peu à peu. Chez les animaux qui succombent ou que l'on sacrifie quelques semaines après l'inoculation, il n'existe pas d'autre lésion macroscopique qu'une hypertro-

phie, parfois assez accentuée, des ganglions trachéo-bronchiques.

Tous les autres modes d'infection et l'inoculation au lapin confirment qu'il s'agit là d'une souche très peu pathogène, sauf à haute dose et par voie veineuse. Les expériences de passage de cobaye à cobaye effectuées pendant plusieurs années par D. E. Cummings et H. S. Willis permettent d'affirmer que l'atténuation du bacille R_1 est aussi irréversible et aussi stable que l'atténuation de la souche BCG, quoique moins accentuée. A dose égale, le bacille R_1 engendre chez le cobaye un état allergique plus intense et plus durable que l'allergie produite par le BCG. Enfin E. R. Baldwin, A. K. Krause et D. Peters, H. S. Willis ont établi depuis longtemps que les animaux préparés par des inoculations de R_1 acquièrent une résistance très nette à l'infection virulente d'épreuve.

C'est sur cette base que nous avons fondé les recherches exposées dans ce mémoire et qui ont pour principal objet l'étude des relations entre l'infection, occulte pour ainsi dire, créée par la souche R_1 d'une part avec l'hypersensibilité à la tuberculine, d'autre part avec l'immunité antituberculeuse.

I. — Caractères et valeur de l'hypersensibilité à la tuberculine produite par le bacille R_1 .

Avec J. Bretey, nous avons montré en 1934, que les cobayes blancs de 500 à 600 grammes, en bon état de santé, auxquels on inocule 1 milligramme de bacilles R_1 sous la peau de la cuisse, commencent à réagir à l'intradermo-tuberculation (0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée au 1/40) vers le septième jour. Les réactions consistent alors en une petite papule œdémateuse ; dans la suite elles deviennent hémorragiques, puis nécrotiques. Pour la même dose de tuberculine, elles conservent la même intensité pendant plus de huit mois.

Si l'on trace la courbe de l'allergie en tenant compte de la dose minima réactionnelle de tuberculine, on constate que l'hypersensibilité croît rapidement du septième au quinzième jour ; mais elle n'atteint toute son ampleur que vers le

quatre-vingtième jour. La dose minima active de tuberculine brute s'abaisse de 10 milligrammes à 0 milligr. 2 dans le stade initial qui se termine vers la fin de la deuxième semaine, puis elle passe de 0 milligr. 2 à 0 milligr. 02 de la troisième semaine à la douzième. Ensuite l'hypersensibilité diminue lentement et assez régulièrement.

Lorsque l'inoculation de bacilles R_1 est effectuée dans la peau, également à la dose de 1 milligramme, en 1 ou 2 piqûres simultanées, l'allergie est un peu plus précoce : la moitié environ des animaux inoculés commencent à réagir le cinquième jour à l'injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée au 1/10 ; au septième jour, la plupart répondent par une papule œdémateuse de 12 à 20 millimètres de diamètre à la même injection ; au quinzième jour, les réactions deviennent plus fortes, hémorragiques dans un tiers des cas environ, puis leur intensité croît comme dans le cas précédent. A la fin de la cinquième semaine, la dose minima réactionnelle est de 0 milligr. 1.

L'allergie apparaît le sixième ou le septième jour après l'inoculation intradermique de 0 milligr. 1 de bacilles R_1 : vers le douzième jour après l'inoculation intradermique de 0 milligr. 01 ; vers le dix-huitième jour après l'inoculation intradermique de 0 milligr. 001. Quelques animaux seulement réagissent entre le dix-huitième et le vingt-cinquième jour après l'inoculation intradermique de 0 milligr. 0001.

La lésion locale d'infection débute le deuxième jour par l'apparition d'un petit nodule du volume d'une tête d'épingle chez les cobayes qui ont reçu 0 milligr. 1 de bacilles R_1 dans la peau ; par une très fine élevation chez ceux qui ont reçu 0 milligr. 01. Cette lésion augmente légèrement pendant quelques jours (grain de poivre dans le premier cas, tête d'épingle dans le second), desquame, puis régresse et se résorbe en quatre à cinq semaines.

Chez les cobayes qui ont reçu 0 milligr. 001 de bacilles R_1 dans la peau, un petit tubercule se forme vers le douzième jour au point de l'inoculation ; vers le dix-huitième jour, le granulome atteint le volume d'une tête d'épingle, puis il se résorbe comme dans le cas précédent.

5 sur 10 cobayes inoculés par scarifications, selon la tech-

nique de L. Nègre et J. Bretey, réagissent déjà, mais faiblement, le sixième jour ; au douzième jour, tous les animaux en bon état de santé répondent à l'épreuve tuberculinique par une papule oedémateuse nette, du diamètre d'une pièce de 0 fr. 50. Le dix-huitième jour, l'intradermo-tuberculation donne de belles papules oedémateuses à centre nécrotique. A la fin de la cinquième semaine, papules nettes après l'injection intradermique de 0 milligr. 2 de tuberculine ; petite papule après l'injection de 0 milligr. 1. La sensibilité à la tuberculine des cobayes ainsi préparés par scarifications (8 traits en grille sur le dos enduits d'une suspension de 10 milligrammes de bacilles R_1 en eau physiologique) est à peu près de même ordre que la sensibilité des cobayes préparés par l'injection intradermique de 1 milligramme de ces germes.

Toutes conditions égales d'ailleurs, l'allergie conférée au cobaye par le bacille R_1 s'installe plus rapidement et se montre nettement plus forte et beaucoup plus durable que l'allergie produite par le BCG. Dans les conditions optima, son intensité peut même égaler celle des animaux infectés par des bacilles virulents ; mais après avoir atteint ce degré assez tardivement (quatre-vingtième jour), l'hypersensibilité tuberculinique des cobayes préparés par l'inoculation de bacilles R_1 s'affaiblit graduellement.

Avec J. Bretey, nous avons pu suivre son évolution pendant près d'une année. Chez les cobayes préparés par une inoculation sous-cutanée de 1 milligramme de R_1 , la dose minima réactionnelle de tuberculine brute est passée de 0 milligr. 02 à la douzième semaine à 2 milligrammes à la fin du onzième mois. Dans les mêmes conditions, H. S. Willis a vu disparaître la sensibilité à la tuberculine au bout de deux ans ; mais il a constaté que si on inocule des bacilles virulents aux cobayes ainsi redevenus anergiques, ils se montrent de nouveau hypersensibles à un très haut degré, après une période d'incubation plus courte que la période antéallergique des cobayes témoins.

II. — Caractères et valeur de l'immunité produite chez le cobaye par le bacille R₁.

Après que Trudeau et de Schweinitz eurent établi que le bacille R₁ provoque chez le cobaye le développement d'une résistance assez marquée contre les surinfections virulentes, E. R. Baldwin et L. U. Gardner, A. K. Krause et H. S. Willis ont employé cette souche dans leurs recherches expérimentales sur l'allergie et l'immunité tuberculeuses. En particulier, c'est en étudiant la dispersion de bacilles pathogènes dans l'organisme des cobayes neufs et dans l'organisme des cobayes préparés par une inoculation de R₁, que A. K. Krause et H. S. Willis ont mis en évidence ce fait d'importance capitale que, chez ces derniers animaux, les bacilles d'épreuve, au lieu de pénétrer dans tous les organes dès les premiers jours de l'infection, restent bloqués sur place pendant un délai plus ou moins long et ne sont retrouvés dans la rate et les poumons, par exemple, que deux à trois semaines après l'inoculation. Néanmoins les cobayes vaccinés par le R₁ et éprouvés contractent une tuberculose progressive, et ils succombent avec des lésions généralisées plusieurs mois après les témoins. Allen Krause en concluait que le caractère essentiel de l'immunité antituberculeuse consiste moins dans l'inhibition complète des activités du bacille de Koch que dans le retard de leur dispersion. C'est également, avec quelques variantes, ce qui ressort des expériences que voici.

A. — ESSAIS DE VACCINATION PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.

1° Epreuve par *inoculation sous-cutanée* de faibles doses de bacilles bovins de *virulence moyenne*.

EXPÉRIENCE 1 (1). — 45 cobayes répartis en 3 lots de 15 animaux ont reçu sous la peau de la cuisse, les uns une seule injection de 1 milligramme, les autres 2 injections de 1 milligramme et 1 milligr. 5 à trente-trois jours d'intervalle et les derniers 3 injections de 1 milli-

(1) Faite avec la collaboration de R. Laporte.

gramme, 1 milligr. 5 et 1 milligr. 5 de bacilles R_1 , à trente jours d'intervalle.

Dans cette expérience, comme dans toutes les expériences suivantes, les bacilles R_1 provenaient de cultures sur pomme de terre glycinée, âgées d'un mois environ. Au moment de l'emploi ils étaient mis en suspension fine dans de l'eau physiologique.

La moitié de ces animaux ont été éprouvés six semaines après la dernière injection, par inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 0002 de bacilles bovins de virulence moyenne (souche Vallée) ; les autres ont reçu, sous la peau également, une dose d'épreuve 10 fois plus faible, soit 0 milligr. 00002 de la même souche.

Sauf chez deux cobayes (série de 3 injections de R_1 , épreuve à la dose de 0 milligr. 0002), qui présentaient des lésions viscérales assez nombreuses, on ne releva à l'autopsie de tous ces animaux, pratiquée cinq mois après l'épreuve, que des adénites inguinales et sous-lombaires et quelques tubercules sur la rate. Tous les témoins, morts ou sacrifiés à partir du quatrième mois après l'infection, étaient atteints de lésions viscérales massives.

D'autres essais de vaccination du cobaye, effectués sur la demande de M. G. Ramon, aux mêmes doses et avec les mêmes bacilles enrobés dans un mélange d'huile et de lanoline (huile deux parties, lanoline une partie) ont donné les mêmes résultats que les précédents, après les mêmes épreuves.

2° Epreuve par *inoculation sous-cutanée* de bacilles humains de virulence moyenne.

EXPÉRIENCE II. — 7 cobayes reçoivent par voie sous-cutanée 2 milligrammes de la souche R_1 , puis cinq semaines plus tard, par la même voie, 0 milligr. 00005 d'une souche humaine de virulence moyenne.

En dehors d'adénites inguinales et sous-lombaires caséuses, les 3 cobayes survivants, qui furent sacrifiés cinq mois après l'épreuve présentaient l'un une seule granulation sur la rate, l'autre de nombreuses granulations sur la rate et les poumons ; le troisième 3 granulations spléniques, de nombreux nodules pulmonaires et de volumineux ganglions trachéo-bronchiques.

Les témoins sont morts de tuberculose généralisée entre la treizième et la seizième semaine.

3° Epreuve par *inoculation intrapéritonéale* de bacilles humains de virulence moyenne.

EXPÉRIENCE III. — Des cobayes reçoivent sous la peau 2 milligrammes de bacilles R_1 et, quarante-cinq jours plus tard, par la voie péritonéale, 0 milligr. 00005 de la souche humaine employée dans l'expérience précédente.

Jusqu'au quatrième mois après l'inoculation virulente, ces cobayes n'ont présenté que des granulations épiploïques plus ou moins nombreuses, souvent accompagnées d'adénites sous-lombaires et mésentériques.

Du quatrième au cinquième mois, on a observé en outre des granulations sur la rate et une hypertrophie des ganglions trachéo-bronchiques, sans lésions pulmonaires apparentes.

Dans la suite, ces lésions se sont accentuées. 7 cobayes sur 10 sacrifiés au cours du septième mois, ont été trouvés porteurs de nombreuses granulations sur la rate, de lésions hépatiques et de nodules pulmonaires. Chez tous, l'épiploon était épaissi et contenait des nodules caséux ou de fines granulations en très grande abondance. Le 8^e n'avait pour toute lésion qu'un ganglion cœcal hypertrophié et caséux ; l'épiploon était normal. Deux enfin étaient totalement indemnes avec un épiploon normal.

Des 6 témoins, 2 sont morts le vingt-deuxième jour après l'inoculation, avec un gros cordon épiploïque criblé de fines granulations ; 1 a succombé le trente-troisième jour avec, en plus des lésions épiploïques, des adénites caséuses sous-lombaires, de nombreuses granulations spléniques et des foyers de nécrose hépatiques ; 2 sont morts le soixante-deuxième jour avec des lésions analogues mais plus étendues. Le 6^e cobaye est mort le soixante-septième jour avec un gros cordon épiploïque criblé de nodules purulents et de nombreuses et importantes lésions du foie, de la rate, des poumons et des ganglions trachéo-bronchiques.

4^e Epreuve par inoculation sous-cutanée de bacilles bovins très virulents.

EXPÉRIENCE IV. — Des cobayes auxquels on avait inoculé, sous la peau, douze semaines auparavant, 1 milligramme de bacilles R_1 , reçoivent également sous la peau, 0 milligr. 0001 de bacilles bovins très virulents.

2 de ces cobayes, morts neuf et dix semaines après l'épreuve, ne présentaient que des adénites caséuses, inguinales et sous-lombaires. Les 4 autres, qui ont succombé cinq semaines plus tard, soit quinze semaines après l'inoculation virulente, étaient tous porteurs de lésions viscérales très étendues.

Les témoins sont morts de tuberculose généralisée massive entre la huitième et la dixième semaine.

D'autres cobayes préparés avec une dose 10 fois plus faible de bacilles R_1 et inoculés comme les précédents, ont fait preuve de la même résistance.

5° Epreuve par inoculation *intrapéritonéale* de bacilles *bovins très virulents*.

EXPÉRIENCE V. — Douze semaines après une inoculation sous-cutanée de 1 milligramme de bacilles R_1 , des cobayes reçoivent, par voie péritonéale, 0 milligr. 0001 de la souche bovine précédente.

Tous les animaux qui ont succombé plus de 9 semaines après cette épreuve, présentaient un énorme cordon épiploïque criblé de nodules et d'abcès caséux, des adénites caséuses sous-lobaires et des lésions viscérales étendues. A partir de la quatorzième semaine, le foie, la rate et les poumons étaient littéralement criblés de nodules. 2 cobayes sur 11 ont vécu seize semaines et 3 dix-huit semaines après l'inoculation virulente.

Les 6 témoins sont morts de tuberculose généralisée, avec de volumineuses lésions épiploïques, entre la onzième et la quatorzième semaine.

6° Epreuve par inoculation *intradermique* de bacilles *bovins de virulence moyenne*.

EXPÉRIENCE VI. — Vaccination d'un lot de cobayes par inoculation sous-cutanée de 1 milligramme de bacilles R_1 . Epreuve six semaines plus tard par inoculation intradermique de 0 milligr. 000025 de la souche bovine de Vallée.

Au moment où cette épreuve a été effectuée, les animaux réagissaient à la tuberculine par une papule hémorragique ou nécrotique.

Vingt-quatre heures après l'inoculation virulente, on observe, au niveau de la piqure, un léger épaissement papuleux de la peau, du diamètre d'une lentille. Le deuxième ou le troisième jour, cette réaction allergique, déjà décrite par A. Krause et D. Peters, fait place au développement progressif d'un nodule dont le centre se nécrose vers le douzième ou le quinzième jour. Ce granulome augmente de volume jusqu'à la fin du deuxième mois (grain de poivre, lentille, rarement pois) et continue à s'ulcérer plus ou moins profondément ; puis il régresse et tend à se cicatriser. Les animaux vaccinés sont morts ou ont été sacrifiés entre le quatrième et le septième mois. L'autopsie a révélé la présence de volumineuses adénites et de quelques tubercules disséminés sur la rate et sur les poumons.

Chez les témoins, le nodule d'infection n'a apparu que vers le douzième jour ; il a ensuite grossi peu à peu et s'est ulcéré comme chez les vaccinés, mais sauf de rares exceptions, il a persisté jusqu'à la mort. Tous les animaux sont morts de tuberculose généralisée avant la fin du cinquième mois.

7° Epreuve par inoculation *intradermique* de bacilles *bovins très virulents*.

EXPÉRIENCE VII. — Vaccination d'un lot de cobayes par inoculation sous-cutanée de 3 milligrammes de bacilles R_1 . Epreuve quinze semai-

nes plus tard par inoculation intradermique de 0 milligr. 0001 d'une souche bovine très virulente.

Comme chez les animaux de l'expérience précédente, la lésion de surinfection a été *précoce et accélérée*. Jusqu'à la quinzième semaine après l'épreuve, il n'a été observé que des lésions locales (chancre cutané) et ganglionnaires (adénites inguinales et axillaires). A partir de la quinzième semaine, il existait des nodules disséminés sur la rate, le foie et les poumons. Localement, le chancre d'infection persistait et, souvent, apparût sur le trajet d'un lymphatique, entre l'ulcère et l'aisselle, en ou plusieurs petits nodules cutanés, durs, bien circonscrits. Ces nodules grossissaient peu à peu, pour atteindre parfois les dimensions d'un grain de poivre ou d'une lentille, s'ulcéraient et suppuraient pendant quelques jours. Le pus qu'ils contenaient renfermait des bacilles tuberculeux en petit nombre, mais de virulence normale, comme l'ont démontré l'inoculation directe et l'inoculation de cultures de passage au cobaye. Une fois vidés de leur contenu, ces abcès se sont *cicatrisés très rapidement*.

A l'autopsie, on a trouvé chez ces animaux, à la face interne de la peau avoisinant le chancre, une grappe ou une chaîne de petits tubercules du volume d'une tête d'épingle, dans lesquels on mit facilement en évidence des bacilles acido-résistants.

6 cobayes sur 12 ainsi vaccinés et éprouvés sont morts entre la dix-huitième et la vingt-sixième semaine avec des lésions hépatiques, spléniques et pulmonaires massives (poumons hypertrophiés, criblés de nodules et de petites cavernes). *Tous étaient encore porteurs du chancre d'inoculation*, atteignant 6 à 8 millimètres de diamètre et recouvert d'une croûte épaisse et de pus. Le pus de cet ulcère contenait des bacilles tuberculeux assez nombreux (1 tous les 2 à 5 champs dans les frottis), aisément cultivables et de même virulence que la souche inoculée.

Chez les témoins (12 cobayes), les lésions spléniques (granulations) étaient déjà nombreuses à la fin de la sixième semaine. Tous les animaux sont morts de tuberculose généralisée entre la neuvième et la treizième semaine, avec un chancre d'inoculation identique à celui des cobayes vaccinés.

EXPÉRIENCE VIII. — Inoculation sous-cutanée de 2 milligrammes de bacilles R_1 . Epreuve trente et un jours plus tard, par voie dermique, comme dans l'expérience précédente.

Chez les vaccinés, les premières lésions viscérales (spléniques) n'ont été observées qu'au cours de la neuvième semaine après l'épreuve ; à ce moment les témoins présentaient déjà des lésions sur tous les organes. Vers la dixième semaine, de petits nodules cutanés, durs, au nombre de deux ou trois, ont apparu chez les vaccinés, à environ 15 millimètres de l'ulcère, répartis sur le trajet horizontal d'un lymphatique (2). Ces petits nodules se sont ensuite ulcérés et, après évacua-

(2) Une observation analogue a été faite en 1920 par A. K. Krause. « Récemment, chez un cobaye d'une série de près de 100 animaux, qui avaient été inoculés par voie intradermique avec des bacilles tuberculeux vivants, il s'est produit un type d'infection que je n'avais

tion de leur contenu purulent assez riche en bacilles, ils se sont parfaitement cicatrisés vers la seizième semaine.

Ces cobayes vaccinés sont morts entre la quinzième et la vingt-quatrième semaine avec les mêmes lésions locales et viscérales que les cobayes de l'expérience précédente.

Tous les témoins sont morts de tuberculose généralisée avant la dix-huitième semaine.

B. — ESSAIS DE VACCINATION PAR VOIE VEINEUSE.

EXPÉRIENCE IX (3). — *Inoculation intraveineuse de 1 milligramme de bacilles R_1 ; épreuve six semaines plus tard par inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 00005 de bacilles humains très virulents.*

En dehors de quelques fins tubercules pulmonaires, reliquat de l'inoculation de bacilles R_1 , on n'a relevé aucune lésion chez les animaux qui ont succombé moins de dix semaines après l'épreuve. Chez un cobaye mort à la fin du cinquième mois, les ganglions inguinaux et sous-lombaires correspondant à l'inoculation étaient hypertrophiés et scléreux, mais il n'existait pas de lésions viscérales. Les lésions de la rate ont apparu vers le septième mois ; dans la suite, les autres organes se tuberculisèrent à leur tour ; les derniers animaux vaccinés ont succombé le dixième et le onzième mois avec des lésions massives.

Les témoins sont morts en dix à quatorze semaines de tuberculose généralisée.

C. — ESSAIS DE VACCINATION PAR VOIE DERMIQUE.

EXPÉRIENCE X. — *Inoculation dans la peau de chaque flanc de 1 milligramme de bacilles R_1 en suspension dans 0 c. c. 1 d'eau physiologique ; épreuve cinq semaines plus tard, par inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 0005 de bacilles bovins très virulents.*

Premières lésions viscérales (rate) à la fin du deuxième mois ; ensuite généralisation progressive avec un retard de plusieurs semaines sur les témoins.

EXPÉRIENCE XI. — *Même vaccination mais par une seule piqûre intradermique de 1 milligramme de bacilles R_1 ; même épreuve.*

Les animaux ainsi vaccinés ont été sacrifiés treize semaines après l'inoculation virulente. Ils présentaient les adénites caséeuses habi-

jamais observé. Au point d'inoculation, la lésion se développa d'abord lentement, comme d'ordinaire, avec formation d'un nodule qui, dans la suite, s'ouvrit et s'ulcéra. L'ulcère persista. Mais alors un certain nombre de nodules tuberculeux apparurent dans la peau, sur le trajet des lymphatiques en avant et en arrière de la lésion. C'était là un phénomène tout à fait exceptionnel qui donna lieu à la formation de nouveaux tubercules dermiques non ulcérés dans la région des ganglions axillaires et inguinaux. (A. K. Krause, *Amer. Rev. Tuberc.*, 4, 1920, p. 123.)

(3) Faite en collaboration avec R. Laporte.

tuelles, quelques granulations sur la rate, quelques foyers hépatiques et des tubercules pulmonaires plus ou moins nombreux.

D'une manière générale, et contrairement à ce que l'on observe presque toujours chez les témoins, les lésions pulmonaires étaient plus nombreuses que les lésions spléniques.

Chez les témoins, les premières lésions viscérales (rate) ont été relevées au début de la sixième semaine. 7 sur 9 sont morts de tuberculose généralisée entre la huitième et la onzième semaine. 2 ont survécu treize semaines ; ils présentaient d'énormes lésions spléniques et pulmonaires.

D. — ESSAIS DE VACCINATION PAR SCARIFICATIONS

EXPÉRIENCE XII. — *Sur la peau du dos, décapée à l'éther, on fait, au moyen d'un vaccinostyle, 6 scarifications en grille et l'on enduit chacune d'elles d'une grosse goutte d'une suspension contenant 10 milligrammes de bacilles R_1 par centimètre cube. Epreuve cinq semaines plus tard, comme précédemment.*

Les plaies de scarifications se cicatrisent en quelques jours. Jusqu'à la huitième semaine, les lésions provoquées par l'inoculation virulente sont limitées aux ganglions inguinaux et sous-lombaires, qui sont hypertrophiés et caséux. A la dixième semaine, on trouve de rares granulations spléniques et de fines granulations pulmonaires. Chez les animaux sacrifiés à la fin de la quatorzième semaine, il existait de rares granulations spléniques et de nombreuses granulations pulmonaires avec une énorme hypertrophie des ganglions trachéo-bronchiques.

Mêmes témoins que dans l'expérience XI.

EXPÉRIENCE XIII. — *Vaccination par scarifications, comme précédemment, mais les bacilles R_1 sont mis en suspension dans de l'huile d'olive. Même épreuve.*

Les animaux sacrifiés à la fin de la quatorzième semaine ne présentaient que des adénites inguinales et sous-lombaires caséuses, de rares granulations sur la rate et, certains, quelques fins tubercules pulmonaires. La résistance qu'ils avaient acquise était nettement plus marquée que celle des cobayes de l'expérience XII. Mêmes témoins que précédemment.

EXPÉRIENCE XIV. — *Vaccination par scarifications comme précédemment, mais les bacilles R_1 sont mis en suspension dans une solution de gomme arabique à 10 p. 100.*

Dès le début du troisième mois, les animaux sont morts avec des lésions tuberculeuses massives, à peu près aussi nombreuses et aussi étendues que celles des témoins.

Développement de l'immunité engendrée par le bacille R₁.

L'expérience suivante a eu pour objet de déterminer après quel délai minimum la résistance aux surinfections virulentes peut être décelée chez les cobayes préparés par des inoculations de bacilles R₁. Pour rendre le phénomène d'immunité plus évident et pour en mieux mesurer la valeur, nous avons employé une dose vaccinnante forte et une dose d'épreuve faible.

Cette expérience a montré que, dans ces conditions, l'immunité devient manifeste entre le quatorzième jour et le vingt-cinquième jour et qu'à partir du vingt-cinquième jour jusqu'au cinquante-sixième, elle reste stationnaire.

EXPÉRIENCE XV. — Quatre lots de cobayes reçoivent sous la peau 6 milligrammes de bacilles R₁. Ceux du premier lot sont éprouvés quatorze jours plus tard par inoculation sous-cutanée de 0 milligr. 00001 de la souche bovine de Vallée.

Ceux du 2^e lot sont éprouvés le vingt-cinquième jour.

Ceux du 3^e lot sont éprouvés le quarantième jour.

Ceux du 4^e lot sont éprouvés le cinquante-sixième jour.

a) *Epreuve le quatorzième jour.* — Des lésions de la rate et du foie ont été observées chez deux cobayes morts à la fin du deuxième mois. Les autres sont morts avec des lésions massives en quatre mois à quatre mois et demi, dans les mêmes délais que les témoins.

b) *Epreuve le vingt-cinquième jour.* — Les cobayes sacrifiés à la fin du quatrième mois n'avaient que des adénites caséeuses, inguinales et sous-lombaires.

c) *Epreuve le quarantième jour.* — Pas d'autres lésions que des adénites inguinales et sous-lombaires avant le troisième mois. Début de généralisation à partir du cinquième mois.

d) *Epreuve le cinquante-sixième jour.* — Apparition des premières lésions viscérales (spléniques) à la fin du quatrième mois.

Les témoins de ces 4 lots, morts ou sacrifiés à la fin du quatrième mois, étaient tous atteints de tuberculose généralisée.

Relations entre l'allergie tuberculinique et l'immunité.

Si le blocage sur place des bacilles virulents d'épreuve — tel qu'un grand nombre d'expériences l'ont mis en évidence chez les animaux infectés ou vaccinés — était uniquement lié à l'hypersensibilité tuberculinique concomitante, on pourrait en

inférer que les effets pathogènes des surinfections sont inversement proportionnels à l'intensité des réactions locales mises en jeu par les corps microbiens, ou, plus exactement, par la tuberculine qu'ils libèrent au lieu de l'inoculation. En ce qui concerne les surinfections cutanées, par exemple, le degré de l'immunité antituberculeuse d'un sujet donné s'exprimerait donc d'après la dose minima de tuberculine ou de corps microbiens capable de produire une papule caractéristique. Corrélativement, les fluctuations de l'hypersensibilité au cours de l'infection traduiraient les variations de la résistance spécifique ; de sorte que si l'on pouvait augmenter, diminuer ou supprimer artificiellement la réactivité à la tuberculine chez un animal vacciné, on verrait parallèlement croître, s'affaiblir, puis disparaître sa résistance aux surinfections exogènes et endogènes. C'est dans le dessein de vérifier cette hypothèse, que nous avons fait les expériences suivantes dont certaines remontent à 1932.

1° RENFORCEMENT DE LA RÉACTION CUTANÉE AUX SURINFECTIONS.

Il est facile d'augmenter les réactions locales de surinfection en provoquant, au lieu même de l'inoculation, un véritable phénomène de Koch par l'injection intradermique d'un mélange d'une faible dose de bacilles virulents vivants et d'une assez forte dose des mêmes germes tués par la chaleur.

EXPÉRIENCE XVI. — *Vingt-huit jours après l'inoculation sous-cutanée de 5 milligrammes de bacilles R_1 , c'est-à-dire au moment où les cobayes donnent une réaction hémorragique ou nécrotique à l'intradermo-tuberculation, on inocule à ces animaux, dans la peau du flanc, un mélange de 0 milligr. 000.001 de bacilles bovins moyennement virulents (souche Vallée) et 0 milligr. 1 de bacilles du même type tués.*

Le lendemain de cette épreuve, on observe une large papule inflammatoire dont le centre est en voie de nécrose. Puis cette papule régresse, se condense et fait place entre le troisième et le quatrième jour, à un nodule du diamètre d'une lentille. Un mois plus tard, ce nodule commence à se résorber et, à la fin du quatrième mois, il n'en reste plus qu'une faible trace.

Sacrifiés le septième mois, les cobayes ainsi surinfectés sont trouvés porteurs d'adénites régionales casécuses et de quelques tubercules spléniques, exactement comme les cobayes vaccinés et éprouvés dans les mêmes conditions, mais sans addition de bacilles morts aux bacilles virulents.

Mais les résultats obtenus sont différents quand l'infection d'épreuve est effectuée à l'intérieur même de l'abcès sous-cutané provoqué par une injection de bacilles R₁ faite quelques semaines auparavant. On espérait ainsi bénéficier de l'action protectrice du tissu de granulation entourant l'abcès et bloquer d'une façon plus efficace la dispersion des bacilles virulents.

EXPÉRIENCE XVII. — *On inocule à des cobayes, sous la peau du flanc, 5 milligrammes de bacilles R₁.*

Dix jours plus tard, 5 de ces animaux sur 6, sont déjà nettement allergiques ; au quatorzième jour, les intradermo-tuberculinations donnent une belle papule avec un foyer de nécrose central ; dans la suite, l'intensité des réactions tuberculiniques s'accroît encore.

L'inoculation de R₁ a provoqué la formation d'un abcès. A la fin de la sixième semaine, on inocule à l'intérieur de la collection purulente, 0 milligr. 00001 de la souche bovine de Vallée, en suspension dans 0 c. c. 1 d'eau physiologique.

Jusqu'à la fin du deuxième mois, l'infection d'épreuve est restée limitée aux ganglions régionaux, puis elle s'est généralisée rapidement. Les animaux sont morts dans le courant du quatrième mois, avec des lésions tuberculeuses très étendues.

Au contraire, chez les cobayes vaccinés de même, mais éprouvés en région saine, l'extension des lésions aux viscères n'a commencé à se produire qu'à la fin du quatrième mois et les animaux ont survécu six à sept mois.

Les cobayes témoins non vaccinés sont morts avec des lésions tuberculeuses massives vers la fin du quatrième mois.

Il semble donc que les bacilles virulents inoculés à l'intérieur de l'abcès produit par le bacille R₁, aient trouvé dans son contenu purulent un milieu extrêmement favorable à leur pullulation ; leur nombre ayant ainsi considérablement augmenté dès les premiers jours, l'épreuve a été, en réalité, beaucoup plus sévère que ne l'indique la dose inoculée.

2° INFLUENCE DE LA DÉSENSIBILISATION SPÉCIFIQUE SUR LA RÉSISTANCE DES COBAYES VACCINÉS PAR LE BACILLE R₁.

Dans nos essais de désensibilisation des cobayes vaccinés par le bacille R₁, nous avons adopté la méthode préconisée en 1908 par Et Burnet et qui consiste à injecter chaque jour, pendant dix jours, de petites quantités de tuberculine. Nous nous sommes généralement tenu à la dose quotidienne de

0 c. c. 025 de tuberculine brute en solution dans 1 cent. cube d'eau physiologique en complétant ce traitement le douzième jour par une injection sous-cutanée d'une dose massive, 1 cent. cube, de la même tuberculine.

Le lendemain, les animaux sont éprouvés sur un des flancs par intradermo-tuberculation (0 c. c. 1 de tuberculine brute diluée au 1/10) pour juger de la désensibilisation, et de l'autre côté par injection intradermique de 0 milligr. 0001 de bacilles virulents.

Selon nos constatations, confirmées par celles d'E. Carlinfanti, la désensibilisation partielle ou totale ainsi obtenue, dure de sept à dix jours. Pour l'entretenir, il suffit donc d'injecter, chaque semaine, la même dose anergisante, c'est-à-dire 1 cent. cube de tuberculine brute.

Un tel traitement a malheureusement pour effet de troubler profondément la santé des animaux: les injections successives de tuberculine se résorbent de plus en plus mal (ce qui, en dehors d'une réaction générale assez marquée dans les heures qui suivent l'injection, témoigne que l'allergie n'est pas totalement éteinte); l'inflammation locale sous-cutanée qui en résulte entraîne la formation d'une sorte de tissu cicatriciel dense, où le liquide injecté pénètre difficilement; parfois la peau se sphacèle dans les mêmes régions; les animaux maigrissent et une forte proportion d'entre eux succombent avant le terme de leur infection.

Quelques-uns seulement, parmi ceux que nous avons vaccinés au moyen d'une injection sous-cutanée de 2 milligrammes de bacilles R₁, désensibilisés à partir du neuvième jour comme il vient d'être dit, et éprouvés le vingt-troisième jour par inoculation intradermique de 0 milligr. 0001, de la souche bovine de Vallée, ont supporté 10 injections hebdomadaires de tuberculine brute. Ils sont morts de quinze à soixante jours après la fin du traitement, c'est-à-dire de trois mois et demi à cinq mois après l'épreuve. Les lésions tuberculeuses qu'ils présentaient étaient identiques en nombre et en étendue à celles des témoins vaccinés et éprouvés, mais non désensibilisés.

Dans une autre expérience, des cobayes ont reçu par voie sous-cutanée, 2 milligrammes de bacilles R₁, puis, du sep-

tième au dixième jour, 0 c. c. 04 de tuberculine brute chaque jour ; 0 c. c. 05 du quatorzième au vingtième jour ; 0 c. c. 1 les vingtième, vingt et unième et vingt-deuxième jours ; 0 c. c. 25 les vingt-troisième, vingt-septième, vingt-neuvième et trentième jours. L'intradermo-tuberculation, effectuée le trentième jour à la dose de 0 c. c. 1 de tuberculine brute, diluée au 1/10, n'a donné qu'une légère infiltration diffuse de la peau. Le trente et unième jour, les 14 cobayes survivants, un nombre égal de cobayes vaccinés non désensibilisés et un nombre égal de cobayes neufs, sont infectés par inoculation intradermique de 0 milligr. 0001 de bacilles bovins très virulents et les injections désensibilisantes sont reprises à raison de 0 c. c. 25 de tuberculine brute les trente-deuxième, trente-septième, quarante et unième et soixante-septième jours.

Le lendemain de l'épreuve, tous les cobayes *vaccinés mais non désensibilisés* présentent, au lieu de l'inoculation, une petite papule oedémateuse blanche, nette ; de la vingt-quatrième à la quarante-huitième heure, cette papule régresse et fait place à un nodule.

Chez les 14 cobayes *vaccinés et désensibilisés*, 3 seulement présentent, le lendemain de l'inoculation virulente, une petite élevation ; les autres n'ont aucune réaction locale ; dans la suite, à partir du cinquième jour, des petits tubercules apparaissent sur les autres cobayes.

Au treizième jour, les cobayes vaccinés désensibilisés ont un tubercule non ulcéré, du volume d'une grosse tête d'épingle au maximum et les cobayes vaccinés non désensibilisés, un nodule du volume d'un grain de poivre à celui d'une lentille, dont le centre est plus ou moins profondément ulcéré.

Chez les cobayes non vaccinés témoins, le granulome cutané d'infection a apparu vers le neuvième jour, puis il a grossi assez rapidement pour atteindre, le treizième jour, le volume d'une tête d'épingle et s'ulcérer.

La désensibilisation ayant cessé le quarante-septième jour après la vaccination et le quinzième jour après l'épreuve, l'allergie redevint normale. Dans les deux groupes de cobayes vaccinés (désensibilisés et non désensibilisés), l'infection évolua au ralenti, de façon identique : ulcération faiblement

extensive du chancre de surinfection, adénites caséeuses de voisinage ; apparition des premières lésions spléniques vers la dixième semaine après l'épreuve, puis généralisation à partir du quatrième mois. Les 6 derniers animaux des deux lots (sur 24 infectés) sont morts entre la vingtième et la vingt-troisième semaine avec des lésions généralisées massives. Leurs poumons étaient envahis presque en totalité par de gros nodules bordés d'une zone pneumonique.

Les cobayes témoins non vaccinés sont morts entre la neuvième et la onzième semaine avec les lésions habituelles.

*
* *

En aucun cas, dans toutes les expériences que nous venons de relater et de nombreuses autres, faites dans des conditions analogues, nous n'avons réussi à conférer au cobaye, au moyen du bacille atténué R_1 , une résistance complète aux infections d'épreuve, si faibles qu'aient été les doses de bacilles virulents inoculés et si fortes qu'aient été les doses de bacilles-vaccins, ce qui confirme une fois de plus la loi formulée par Bruno Lange, selon laquelle les processus tuberculeux susceptibles de guérir coïncident avec une résistance légère, alors que les processus graves et évolutifs créent une immunité très solide.

Sans doute les effets protecteurs du bacille R_1 apparaissent-ils avec plus d'évidence lorsque les germes de surinfection sont tant soit peu atténués : les lésions viscérales se dessinent tardivement ; elles restent peu nombreuses et offrent peu de tendance à s'accroître et à essaimer. Elles sont néanmoins constantes, et il ne semble pas qu'on puisse escompter leur régression ou même leur stabilisation.

Quand on emploie des germes pleinement virulents pour l'épreuve, même à très faible dose, la résistance des cobayes vaccinés cède facilement : les lésions tuberculeuses évoluent sans répit vers la généralisation comme chez les témoins, mais un peu plus lentement.

Ce retard dans la marche de la surinfection porte surtout sur la première phase de la maladie, au cours de laquelle les lésions viscérales prennent naissance et s'organisent ; à

partir du moment où elles commencent à se développer sur les organes, sur la rate en particulier — qui est généralement la première atteinte —, l'évolution de la tuberculose se poursuit presque avec la même vitesse que chez les témoins.

Il paraît assez vraisemblable de supposer que ce retard dans le développement de la surinfection est lié à l'obstacle que la dispersion initiale des bacilles virulents rencontre dans les réactions inflammatoires amplifiées par l'état allergique créé par la vaccination ; ainsi la résistance prendrait sa source dans les modifications tissulaires, banales ou spécifiques, traduites par les réactions cutanées à la tuberculine ou aux corps microbiens. Sous cet aspect, l'immunité relative des cobayes préparés par le bacille R. ne serait autre qu'une manifestation de l'hypersensibilité qu'ils ont acquise ; nous reviendrons tout à l'heure sur ce point à propos de la résistance des cobayes vaccinés et désensibilisés.

*
* *

La voie de l'inoculation n'est pas indifférente dans la production de l'immunité ; l'inoculation intradermique (piqûres ou scarifications) et l'inoculation intraveineuse donnant incontestablement les meilleurs résultats. Pour l'épreuve, au contraire, toutes les voies conviennent ; mais l'inoculation intradermique offre ce grand intérêt pour l'expérimentateur, qu'elle permet de suivre de jour en jour toutes les réactions locales que provoque l'inoculation virulente, depuis la réaction initiale précoce, du type tuberculinique et la formation accélérée du granulome qui lui succède à bref délai, jusqu'au développement du chancre dont l'évolution donne la mesure de l'immunité.

Quand la résistance acquise est assez forte ou la surinfection de faible intensité, tant par le nombre que par la virulence des bacilles, le granulome se nécrose rapidement à son centre et augmente de volume pendant quelques semaines jusqu'à atteindre les dimensions du granulome des témoins ; puis il régresse peu à peu et tend à se cicatriser ; parfois même il se résorbe complètement sans laisser d'autre trace

qu'un léger épaissement de la peau (4). Si la dose de bacilles inoculés est relativement forte ou leur virulence très grande, le granulome s'ulcère plus largement et fait place à un chancre qui persiste jusqu'à la mort de l'animal.

L'accélération initiale du granulome de surinfection chez les cobayes vaccinés peut être attribuée à un drainage plus rapide et plus complet, vers le point de piqure, des bacilles d'épreuve que l'inoculation avait dispersés dans une petite zone du derme avec les quelques gouttes du liquide où ils se trouvaient en suspension. Faisant suite à la réaction précoce d'ordre tuberculinique que provoque l'inoculation intradermique, cette concentration des germes et, conséquemment, des produits qui en sont libérés, active l'irruption et la prolifération, dans le voisinage, des éléments cellulaires qui participent à l'édification du tubercule. Dans cet ordre de faits, R. Laporte a constaté que, dès les premiers jours de la surinfection, la structure folliculaire est plus nette et les cellules géantes sont plus nombreuses qu'au niveau de la primo-infection.

Il est logique de penser que cette modification réactionnelle imprimée par le bacille R₁ est sous la dépendance de l'hypersensibilité qu'il engendre. Et cette hypothèse serait immédiatement vérifiée si, à la suite d'un traitement tuberculinique convenable, permettant d'obtenir leur désensibilisation complète, les cobayes vaccinés et éprouvés par voie dermique se comportaient alors comme des cobayes neufs, avec la même période d'incubation pour l'apparition du granulome et la même évolution dans les mêmes délais. Or, si la désensibilisation aussi poussée que possible a pour résultat d'empêcher la réaction papuleuse initiale de nature tuberculinique qui débute quelques heures après la surinfection et persiste deux ou trois jours, elle ne modifie que très légèrement l'incubation du granulome : celui-ci débute deux ou trois jours plus tard que chez les cobayes allergiques et toujours plus tôt que chez les témoins non préparés (dixième

(4) Cette guérison spontanée, apparente pour le moins, du chancre d'inoculation, peut également se produire dans la primo-infection, chez les cobayes inoculés avec de très faibles doses de bacilles de virulence moyenne.

jour dans les mêmes conditions d'épreuve). L'objection suivant laquelle la désensibilisation n'a pas été conduite assez loin pour ralentir les réactions locales tuberculeuses est contredite par le fait ci-dessus signalé que l'allergie des cobayes soumis à ce traitement est affaiblie à un point tel que leur peau se montre à peu près indifférente à de fortes doses de tuberculine.

Bien que la réaction papuleuse de surinfection soit totalement supprimée par le traitement tuberculinique anergisant, l'accélération des réactions cellulaires édifiatrices et leur renforcement, qui sont peu influencés par ce traitement, représentent encore, indubitablement, des manifestations allergiques. Pour expliquer leur persistance dans les conditions que nous venons d'exposer, il faut donc admettre que la désensibilisation porte principalement son action sur le fonctionnement des capillaires intéressés dans les réactions allergiques, en inhibant leur motricité et diminuant leur perméabilité au contact de la tuberculine ou des corps microbiens ; au contraire, les éléments cellulaires qui interviennent dans le drainage centripète des bacilles d'épreuve et dans la formation du tubercule cutané, conserveraient intacte, malgré la désensibilisation, la suractivité physiologique imprimée par la vaccination.

Puisqu'il continue à se produire chez les animaux désensibilisés et qu'il semble revêtir les caractères d'une « réaction protectrice », le drainage précoce des bacilles de surinfection, d'où résulterait l'accélération du granulome, pourrait être considéré comme un phénomène d'immunité. Mais cette opinion est infirmée par nos expériences antérieures qui ont montré que des cobayes sensibilisés à la tuberculine par une injection de bacilles morts, sans que leur résistance aux surinfections soit apparemment augmentée, réagissent également par un tubercule accéléré aux inoculations intradermiques de bacilles virulents.

Ce qui tend, d'autre part, à prouver que les modifications immunitaires acquises n'interviennent pas dans le stade initial du tubercule cutané d'épreuve, c'est ce fait que toute altération profonde de la nutrition, déterminant un état cachectique assez prononcé, entrave la formation du granulome, sans

ralentir le développement des lésions ganglionnaires ou viscérales, comme elle fait disparaître la réactivité de la peau à la tuberculine chez les sujets tuberculeux sans diminuer leur résistance aux surinfections.

*
* *

L'influence, sur l'évolution du granulome, de la résistance acquise au moment de la surinfection ne se manifeste guère avant plusieurs semaines. Par exemple, chez les cobayes vaccinés par une inoculation sous-cutanée de 1 milligramme de R_1 et éprouvés six ou sept semaines plus tard par inoculation intradermique d'une très faible dose de bacilles virulents, le nodule de surinfection commence à se nécroser vers le quinzième jour, mais il grossit jusqu'au deuxième mois, pendant que le processus ulcéreux gagne toute sa surface. Dans la suite, il régresse et se cicatrise peu à peu ; sa guérison peut même être complète alors que les lésions tuberculeuses des organes profonds, de même origine, continuent de s'accroître et de se multiplier. Chez les cobayes témoins, le chancre persiste le plus souvent jusqu'à la mort qui survient entre le quatrième et le sixième mois.

Il n'est pas indifférent, pour l'étude de l'immunité anti-tuberculeuse, de noter ici que l'extensivité du chancre de primo-infection est toujours assez restreinte, elle est même presque nulle dans les dernières semaines de la maladie et, sauf s'il relève d'inoculations massives, il est exceptionnel que le diamètre de l'ulcère dépasse quelques millimètres. L'éventualité de sa guérison, dans la primo-infection, si rare qu'elle soit, témoigne mieux encore du changement cellulaire favorable qui se manifeste dans le foyer initial, au cours des progrès de l'infection tuberculeuse.

Or, cet « effort curateur » de l'organisme est beaucoup plus important et beaucoup plus efficace chez les cobayes vaccinés et éprouvés qui, d'ailleurs, se montrent réfractaires à toute nouvelle surinfection exogène et y répondent, comme chacun sait, par un phénomène de Koch. Donc les réactions d'immunité développées par le bacille R_1 , loin de se confondre avec les réactions de même nature, mais plus intenses, mises en

jou ultérieurement par l'infection virulente, s'y ajoutent et l'amplifient. Cet exemple d'addition immunitaire, continue et durable, incite à penser que la vaccination résulte moins de l'acquisition de propriétés nouvelles, humorales ou cellulaires, que d'un renforcement spécifiquement orienté de propriétés tissulaires ou cellulaires normales. D'où les différences considérables que l'on observe d'une espèce à l'autre, suivant sa réceptivité naturelle, dans les effets protecteurs des différentes méthodes de vaccination qui leur sont appliquées.

*
* *

Le tableau change quand on emploie des doses tant soit peu élevées pour l'épreuve ou un bacille très virulent.

Dès que la phase d'hypersensibilité est terminée (réaction papuleuse précoce, développement accéléré du nodule), l'évolution du granulome se poursuit comme chez les témoins, c'est-à-dire que l'ulcération continue de s'élargir et de se creuser pendant plusieurs semaines ; elle reste ensuite stationnaire mais n'offre aucune tendance à se cicatriser. Cependant la marche de la tuberculose d'épreuve est encore nettement ralentie et ce ralentissement d'une infection très virulente par la vaccination permet d'assister à l'apparition, au cours du troisième mois — soit au début du deuxième tiers de la maladie —, dans le voisinage du chancre d'inoculation ou sur le trajet des lymphatiques efférents, de petits nodules intra-cutanés dont les plus superficiels s'ouvrent spontanément, se vident de leur contenu assez riche en bacilles virulents et se cicatrisent comme une plaie banale. La rapidité avec laquelle ces nodules secondaires évoluent vers la guérison complète et définitive, contraste non seulement avec la ténacité de la lésion cutanée initiale, mais encore avec le caractère progressif et l'incurabilité des lésions viscérales qui coexistent chez le même animal, c'est-à-dire de lésions créées à peu près dans les mêmes délais après l'infection virulente, par des métastases bacillaires de même provenance. Cette constatation montre clairement que, chez le cobaye, la peau bénéficie au maximum de l'immunité engendrée par l'infection bacillaire, alors que les organes profonds, ganglions lymphatiques,

tiques compris, conservent une réceptivité plus ou moins grande et continuent de se laisser envahir graduellement par le processus tuberculeux : *l'immunité même complète du tégument n'implique donc pas que l'organisme tout entier opposera en tous points la même barrière aux surinfections endogènes.* C'est d'ailleurs à une conclusion analogue sur l'aptitude différente des tissus à subir l'action pathogène des bacilles d'épreuve que nous avaient conduit nos expériences antérieures sur les surinfections exogènes.

*
* *

Si l'hypersensibilité et l'immunité paraissent suivre une marche parallèle, au moins pendant leur phase ascensionnelle, cela ne signifie nullement qu'elles sont étroitement liées l'une à l'autre et que, en particulier, comme certains auteurs l'affirment, l'immunité soit une fonction de l'allergie, l'allergie s'entendant ici dans le sens d'hypersensibilité tuberculinique.

Chez le cobaye, l'intensité de l'allergie est en relation avec la dose de bacilles R_1 inoculés et, dans une certaine mesure, avec la voie de l'inoculation ; *elle peut atteindre le même niveau que l'hypersensibilité produite par les bacilles virulents et se maintenir très élevée pendant plusieurs mois.* Au contraire, et il faut insister sur cette discordance, quelle que soit la dose inoculée et *quelle que soit la vigueur de l'allergie*, la résistance aux surinfections conférée par la souche R_1 reste partielle : même dans les circonstances les plus favorables, elle n'atteint jamais la valeur de l'immunité créée par l'inoculation de bacilles virulents. La perte de ses propriétés pathogènes influence donc beaucoup plus le pouvoir immunisant du bacille R_1 que ses propriétés sensibilisantes.

D'autre part, il serait difficile de trouver une relation de cause à effet entre le mécanisme vasculo-nerveux des réactions d'hypersensibilité et le mécanisme immunitaire de la destruction des bacilles d'épreuve, par quoi se manifeste finalement la résistance spécifique acquise. Que le premier acte de cette résistance, c'est-à-dire le retard à la dispersion des bacilles de surinfection, dépende de l'intensité des réactions

allergiques. c'est là une hypothèse que les caractères cytologiques des réactions locales rendent assez plausible. Mais cette dépendance paraît extrêmement lâche, puisque le traitement qui supprime presque totalement chez l'animal vacciné et allergique, la faculté de réagir à la tuberculine, ne modifie en rien l'évolution de la tuberculose d'épreuve, même quand cette désensibilisation est entretenue jusqu'au terme de la maladie.

A. Saenz a d'ailleurs montré que chez les cobayes rendus hyperergiques au moyen de bacilles tuberculeux morts enrobés dans de l'huile de vaseline, puis désensibilisés par le traitement tuberculinique, le transit des germes virulents du lieu de l'inoculation à la rate, s'effectue avec le même retard, par comparaison avec les témoins normaux, que chez les cobayes hyperergiques et non désensibilisés. K. E. Birkhaug avait fait des constatations semblables en étudiant la dispersion des bacilles virulents eugoniques dans l'organisme des cobayes infectés par des bacilles bovins dysgoniques et maintenus en état de désensibilisation.

Par analogie avec ce qui se passe dans le tissu conjonctif sous-cutané, le derme et la cavité péritonéale, on est fondé à admettre que le blocage des germes de surinfection se produit également dans tous les foyers viscéraux qui se constituent lors des premiers essaimage bacillaires ; ainsi s'expliquerait la lenteur de la tuberculose chez les cobayes vaccinés par le bacille R_1 ; en outre, ce ralentissement semble propice à l'organisation d'un tissu cicatriciel peu perméable autour de ces foyers. Mais ce sont là, en vérité, deux aspects secondaires du problème de l'immunité antituberculeuse, dont la solution exige avant tout de préciser la nature, la genèse et le mode d'action des facteurs qui déterminent ce renversement de la réceptivité naturelle des tissus à l'infection bacillaire et président à l'investissement cellulaire et à la mort des bacilles d'épreuve.

BIBLIOGRAPHIE

- BALDWIN (E. R.) et GARDNER (L. U.). *Am. Rev. Tuberc.*, **5**, 1921, 429.
 BIRKHAUG (K. E.). *Acta Scand. Tuberc.*, **41**, 1937, 25.
 BOQUET (A.). *Ces Annales*, **50**, 1933, 5 ; *C. R. Soc. de Biol.*, **410**, 1932, 65 et 902 ; **412**, 1933, 843 et 1168.

- BOQUET (A.) et BRETEY (J.). *Ces Annales*, **52**, 1934, 252.
BOQUET (A.) et LAPORTE (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **125**, 1937, 19.
BURNET (E.). *C. R. Soc. de Biol.*, **65**, 1908, 307.
CARLINFANTI (E.). *Ces Annales*, **57**, 1936, 134.
CUMMINGS (D. E.). *Am. Rev. Tuberc.*, **26**, 1932, 369.
GARDNER (L. U.). *Am. Rev. Tuberc.*, **28**, 1933, 884.
KRAUSE (A. K.). *J. Med. Res.*, **30**, 1916, 25 ; *Am. Rev. Tuberc.*, **3**, 1919, 1 ; **4**, 1920, 123 ; **14**, 1926, 123.
KRAUSE (A. K.) et PETERS (D.). *Am. Rev. Tuberc.*, **4**, 1920, 551.
KRAUSE (A. K.) et WILLIS (H. S.). *Am. Rev. Tuberc.*, **4**, 1920, 563.
LANGE (B.). *VIII^e Confér. Un. intern. contre la tuberc.*, La Haye, 6-9 septembre 1932, p. 79.
LANGE (B.) et LYDTIN (K.). *Zeit. f. Hyg.*, **110**, 1929, 209.
LAPORTE (R.). *C. R. Soc. de Biol.*, **115**, 1934, 931 et 1206.
NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). *Bull. Acad. Médec.*, **121**, 1939, 886 ; **123**, 1940, 26. — *Ces Annales*, **66**, 1940, 189.
SAENZ (A.). *C. R. Soc. de Biol.*, **130**, 1939, 219.
TRUDEAU (E. L.). *Brit. Med. Journ.*, **2**, 1897, 1849.
WILLIS (H. S.). *Am. Rev. Tuberc.*, **11**, 1925, 427 et 439 ; **17**, 1928, 240 ; **28**, 1933, 884.

MÉTABOLISME ET ÉVOLUTION DES BACTERIES CELLULOLYTIQUES ANAÉROBIES LIBRES ET PARASITES

Par J. POCHON.

(*Institut Pasteur.*)

INTRODUCTION.

LA FONCTION CELLULOLYTIQUE. — Le pouvoir de dégrader la cellulose, puis, à partir des produits simples ainsi obtenus, le pouvoir de refaire la synthèse de composés organiques complexes, sont très diversement répartis dans le monde vivant. Les agents de cette dégradation, les cellulases, sont en effet l'apanage de groupes physiologiques disséminés au milieu de groupes zoologiques et botaniques très divers et ne se superposent en rien à la systématique.

Dans le règne animal, les Métazoaires doués de cette fonction se rencontrent dans l'embranchement des Mollusques Lamellibranches (Térédinés), Gastéropodes (*Pterocera*) et Pulmonés [*Helix*] (1). L'embranchement des Insectes vient au second rang avec quelques espèces sécrétant des cellulases, chez les Orthoptères (Acridiens) et Coléoptères. Enfin, dans l'embranchement des Crustacés (Décapodes et Isopodes), on trouve des diastases proches des cellulases, diastases hydrolysant les mannanes et manno-galactanes. Il n'a jamais été possible de mettre en évidence une cellulase chez les Mammifères, dont certains ont, cependant, des composés cellulosiques à la base de leur alimentation ; ce sont, dans ce cas, les bactéries du tube digestif qui sont responsables de la digestion.

Chez les Protozoaires, la même distribution sporadique est également retrouvée ; les cellulases se trouvent surtout chez les espèces parasites vivant dans la panse des Ruminants

(1) Il s'agit en réalité d'une diastase proche des cellulases, la « lichénase ».

(Ophryoscolécidés et Isotrichidés), le cæcum du cheval (*Cycloposthium*) et le rectum des termites.

Dans le règne végétal, l'élaboration de cellulase est la propriété de certains champignons Ascomycètes, Basidiomycètes, Phycomycètes, Déutéromycètes. .

Cette même répartition irrégulière des espèces cellulolytiques se retrouve chez les Schizomycètes ; les uns sont anaérobies, les autres aérobies. Il y a lieu de fixer dès maintenant une distinction et une définition capitales : un certain nombre de germes croissent et exercent leur fonction cellulolytique à la fois en aérobiose et en anaérobiose, et rentrent donc dans le groupement physiologique des anaérobies facultatifs ; à cette notion vague, il convient d'opposer la notion précise d'aérobiose et anaérobiose « fonctionnelles » par laquelle s'opposent très nettement deux grands groupements de bactéries cellulolytiques : les aérobies fonctionnels sont ceux dont le métabolisme de fermentation de la cellulose donne de l'oxycellulose ; les anaérobies fonctionnels la dégradent au contraire jusqu'aux acides gras volatils et fixes, parfois de l'alcool et des gaz. Cette opposition de métabolisme est capitale, car son omission ferait classer parmi les « facultatifs » des germes dont toute la biologie correspond à celle des anaérobies : tel germe fait fermenter la cellulose en aérobiose avec formation d'acides acétique et butyrique, c'est en réalité un anaérobie fonctionnel. Winogradski, traitant de la pureté des cultures, écrit « que toute trace d'acide dans le métabolisme de la fermentation doit faire soupçonner l'ingérence des anaérobies ». C'est aux cellulolytiques anaérobies fonctionnels qu'est limité ce travail.

ETAT ACTUEL DE LA QUESTION. — Il serait facile d'opposer le petit nombre des espèces anaérobies décrites à celui, bien plus considérable, des aérobies. En réalité, ceux-ci pourraient sans doute être ramenés à un nombre d'espèces beaucoup plus restreint, avec des variétés plus ou moins nombreuses rattachées aux *Cell-vibrio*, *Cell-falcula*, *Spirocheta cytophaga*, *Cellulomonas* et certains *Clostridium* ; le pouvoir fermentaire, plus ou moins stable, vis-à-vis de divers glucides, ne suffit pas pour l'identification d'espèces qui ne seraient

différentes qu'à ce point de vue et seraient semblables en tous autres points.

La question des anaérobies est d'ailleurs encore pleine d'obscurité, au point que Coolhas a pu écrire, en 1928, que « le problème de la fermentation bactérienne de la cellulose est encore complètement irrésolu ». Les difficultés du problème se groupent sous un double chef. Tout d'abord, bactériologiquement parlant, il est à peu près impossible d'affirmer la pureté des souches ; l'utilisation de la technique des colonies ou des germes isolés est presque toujours impossible et, dans les rares cas où les auteurs ont pu l'utiliser, les souches présentaient encore un polymorphisme très net avec variations plus ou moins considérables, dans les repiquages ultérieurs, des formes et même des propriétés biologiques : pour l'interprétation de ces faits, des hypothèses diverses ont été proposées : certains auteurs parlent de « contaminants » qu'il serait impossible d'éliminer et qui seraient toujours associés, dans les cultures, aux bactéries cellulolytiques ; d'autres pensent que la cellulolyse n'est possible que grâce à la symbiose de germes divers ; d'autres, enfin, admettent l'existence d'un « cycle » chez les bactéries cellulolytiques, cycle, d'ailleurs encore non élucidé, qui expliquerait les variations morphologiques et biologiques des souches.

Le second ordre de difficultés est plus ou moins lié au précédent ; on conçoit qu'il soit extrêmement difficile de donner une description précise de souches instables, ou mixtes, ou contaminées (suivant l'interprétation adoptée) et, partant, d'identifier des espèces nouvelles. En 1934, R. Meyer écrivait que la grande variabilité des espèces interdisait toute classification rigoureuse et que, tant que les conditions physiologiques de culture ne seraient pas rigoureusement définies, l'individualisation d'espèces nouvelles ne serait pas justifiée.

LES BUTS DE CE TRAVAIL. — Nous avons essayé, non pas de résoudre ces difficultés, mais d'apporter une contribution à leur étude et, dans la mesure des résultats obtenus, de fournir un cadre à l'expérimentation ultérieure sur les bactéries cellulolytiques anaérobies.

Nous avons cherché, dans un premier chapitre, à opposer

les formes libres, trouvées dans le sol, les boues..., et les formes parasites trouvées dans le tube digestif des animaux. En d'autres termes, nous avons étudié les caractères adaptatifs à la vie parasitaire. Il y a d'ailleurs lieu d'opposer dès maintenant, à ce point de vue, les bactéries qui ne font que traverser le tube digestif et dont les caractères adaptatifs sont nuls (parasites occasionnels) et celles qui y prolifèrent réellement, et s'y adaptent, en modifiant leurs caractères ; ce sont les vrais parasites ; on conçoit que tous les intermédiaires entre ces deux types pourront être trouvés.

Dans un deuxième chapitre, nous montrerons que l'ensemble des bactéries cellulolytiques anaérobies peut être classé en deux grandes séries physiologiques opposables par leur métabolisme de fermentation : les acéto-butyriques et les formo-acétiques.

Le troisième chapitre sera consacré à l'étude de l'évolution des souches qui, au laboratoire, repiquées en série linéaire et continue, pendant des périodes variant de un à quatre ans, s'est manifestée dans des limites plus ou moins étendues ; cette évolution a été double : nous avons, en effet, assisté à la perte plus ou moins complète des caractères adaptatifs à la vie parasitaire, chez certaines souches parasites, d'une part, et, d'autre part, l'évolution s'est parfois faite dans le sens de la perte du pouvoir cellulolytique lui-même, vers un pouvoir glucidolytique étendu.

Enfin, dans le quatrième chapitre, nous proposerons une interprétation des faits observés relatifs à la pureté des souches, en fonction des phénomènes d'évolution cités ci-dessus.

PARASITISME ET VIE LIBRE

CHEZ LES BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES ANAÉROBIES.

Les premiers isollements de bactéries cellulolytiques anaérobies ont été faits à partir du sol, des boues et des limons ; ces isollements ont pu être réalisés assez facilement dans des milieux minéraux où l'azote était fourni sous forme ammoniacale ou nitrique ; dans ces mêmes milieux, les bactéries, au cours des repiquages ultérieurs, conservaient leur pouvoir cellulolytique.

Il en a été tout autrement lorsqu'on a voulu isoler et cultiver des bactéries cellulolytiques du tube digestif de l'homme ou des animaux ; les premiers repiquages aboutissaient bien à la cellulolyse, mais celle-ci devenait de plus en plus lente et faible, puis finissait par s'arrêter à mesure que la culture devenait plus pure. La cellulolyse ne pouvait être maintenue qu'en utilisant des milieux très particuliers, contenant des extraits du contenu digestif de l'hôte (première culture obtenue par Y. Khouvine, 1923), ou bien en associant à la bactérie cellulolytique une ou plusieurs autres bactéries, la cellulolyse étant alors maintenue grâce à cette symbiose. Nous ne reviendrons pas ici sur les discussions soulevées par ces faits : il est à peu près admis actuellement que les formes parasites ont besoin, pour leur croissance, d'une source azotée à un degré de dégradation parfaitement défini pour chaque espèce ; cette source azotée peut être fournie par un extrait du contenu du tube digestif de l'hôte habituel, auquel la bactérie s'est adaptée, ou bien par un composé azoté (peptone par exemple) moins dégradé, que les bactéries associées amènent au degré voulu ; il ne s'agit donc pas d'une cellulolyse par symbiose bactérienne, au sens strict du mot, mais bien par la seule bactérie cellulolytique, les bactéries associées ne servant qu'à permettre la nutrition et la prolifération des cellulolytiques. Il est vraisemblable, d'ailleurs, que les extraits de contenu digestif apportent également des facteurs adjuvants de croissance encore mal définis.

Nous avons déjà signalé ailleurs les caractères que nous considérons comme « parasites » ; après la description des souches libres et parasites nous reviendrons sur les données fondamentales de cette distinction.

A. LES FORMES PARASITES. — Le seul germe à caractères parasites, obtenu en culture pure, a été isolé des matières fécales humaines, puis du tube digestif de divers animaux et du fumier, par Y. Khouvine, en 1923 ; au point de vue morphologique, c'est un bâtonnet à spore terminale ovulaire, ne se colorant pas par la méthode de Gram : *B. cellulosae dissolvens* (les caractères cités ci-dessus doivent en réalité le faire ranger parmi les Plectridiales terminosporacées, genre

Caduceus, A.-R. Prévot, 1938). Du point de vue particulier de ses caractères adaptatifs à la vie parasitaire, il faut signaler qu'il ne peut être cultivé qu'en présence d'extrait fécal humain ; dans ces conditions, c'est un anaérobie strict qui ne fait fermenter que la cellulose, avec formation d'un pigment jaune ; il est impossible de le cultiver dans les milieux banaux, quelles que soient les sources azotées et carbonées, en l'absence d'extrait fécal et de cellulose.

Nous avons isolé en culture pure 6 souches parasites. Au point de vue morphologique, ce sont des bâtonnets à spore terminale, se colorant par la méthode de Gram (*Plectridiales*, *Plectridiaceae*, genre *Plectridium*, A.-R. Prévot). Nous ne retiendrons ici que leurs caractères parasitaires.

« C.A.P. », isolé des fèces de cobaye, n'est cellulolytique qu'en présence d'extrait fécal ; il ne fait fermenter que la cellulose, avec formation d'un pigment jaune ; il se distingue de *Cad. cellulosa dissolvens* par le fait qu'il peut être cultivé en eau peptonée (P. Defresne à 2 p. 100) de façon transitoire ; la culture est maigre et s'arrête après deux ou trois repiquages. « A », isolé de matières fécales humaines, se distingue de la souche précédente par la formation très réduite de pigment ; celui-ci est jaune pâle et fugace.

Les souches « C.E.P. », « C.N.P. », isolées des matières fécales de cobaye et « S. », « H », isolées de matières fécales humaines, de même que *Pl. cellulolyticum*, isolé de la panse de divers Ruminants, ne forment pas de pigment et ne sont cellulolytiques qu'en présence d'extrait, mais peuvent être cultivées indéfiniment, sans cellulolyse, dans l'eau peptonée.

B. LES FORMES LIBRES. — Les formes décrites par les auteurs peuvent être ramenées à quatre, dont la description est suffisante pour les élever au rang d'espèce : *Cad. cellulosa hydrogenicus*, *Cad. cellulosa methanicus* (Omelianski) [réserve faite des discussions soulevées par ces deux souches au sujet de leur pureté, de leur pouvoir cellulolytique et de leur autonomie], *Cad. cellulosa solvens* (Cowles et Rettger), *Terminosporus thermocellus* (Fred, Viljoen et Peterson) qui sont toutes des *Plectridiales* ne se colorant pas par la méthode de Gram ; il faudrait cependant y ajouter deux *Plectridiaceae*, innommées, décrites par V. Meyer (1933) et par Snieszko (1933).

Ces espèces sont toutes caractérisées, du point de vue qui nous occupe, par le fait qu'elles font fermenter la cellulose

en utilisant une source azotée simple, ammoniacale ou nitrrique et n'ont pas besoin des extraits complexes nécessaires aux formes parasites ; elles ne forment pas de pigment ; elles peuvent être cultivées en eau peptonée, sans cellulolyse bien entendu.

Nous avons isolé des écumes de sucrerie, avec A.-R. Prévot, une espèce nouvelle, *Pl. spumarum*. Comme les espèces précédentes, elle est cellulolytique sans extrait complexe, ne donne pas de pigment et est cultivable en eau peptonée.

Il est donc possible d'opposer maintenant les formes libres et parasites, grâce à un certain nombre de caractères. Le plus important est sans contredit la nécessité ou non d'un extrait de contenu de tube digestif, agissant comme source d'azote et comme facteur de croissance. Ce caractère traduit au plus haut point l'adaptation d'un germe au contenu intestinal de l'hôte. Cette adaptation peut être poussée très loin : c'est ainsi qu'une souche de *Pl. cellulolyticum*, que nous avons isolée de la panse de chevreuil, n'était cellulolytique que dans un milieu à l'extrait de panse de chevreuil et non à l'extrait de panse de bœuf ; de fait, la nourriture des ruminants sauvages influe sur les propriétés du contenu de leur panse : celui-ci est à pH = 6,5, alors que celui de la panse de bœuf est à pH = 7,5 ou 8. Le deuxième caractère, en réalité partiellement lié au précédent, est le fait de pouvoir être cultivé ou non en eau peptonée : la fonction cellulolytique mise à part, les germes très adaptés au milieu intestinal sont même incapables d'être cultivés sans extrait. Enfin, la formation d'un pigment est en général l'apanage des formes parasites.

Il y a lieu, avant de terminer ce chapitre, de faire quelques remarques : tout d'abord, on peut trouver, dans le tube digestif, des cellulolytiques qui présentent les caractères des formes libres ; ils sont toujours peu nombreux et correspondent aux parasites occasionnels que nous avons déjà cités : ce sont des germes cellulolytiques du sol qui ne font que traverser le tube digestif. Inversement, dans les sols cultivés et les fumiers on peut trouver des germes à type parasite, amenés par les déjections d'animaux. Ce n'est donc pas le lieu occasionnel de prélèvement qui permet de distinguer les deux types. En second lieu, il faut signaler l'existence de types intermédiaires, qui

ont été trouvés dans le tube digestif de larves xylophages d'insectes (*Potosia cuprea*, par Verner ; *Rhagium sycophanta* et *Tipula oleracea*, par nous-même) ; le milieu digestif de ces larves est fort peu différencié ; les caractères adaptatifs sont donc faibles, aussi les bactéries isolées peuvent présenter des caractères de l'un et l'autre type. C'est ainsi que *T. cellulosam fermentans* de Verner forme un pigment brun noir, mais peut être cultivé sans extrait. Inversement, les souches que nous avons isolées des larves citées plus haut ne forment pas de pigment, mais ne peuvent être cultivées, au début de leur isolement tout au moins, qu'en présence d'extrait fécal.

LES GROUPEMENTS PHYSIOLOGIQUES.

Les bactéries cellulolytiques, décrites jusqu'à ce jour, le sont rarement de façon complète : ou bien il s'agit de travaux de bactériologistes qui négligent fréquemment d'étudier le métabolisme biochimique des germes, ou bien de travaux d'intérêt industriel dans lesquels la notion de pureté des souches utilisées n'est qu'accessoire. Cependant, de la description d'un petit nombre de souches suffisamment étudiées, il ressort que les acides gras volatils représentent, en carbone, la plus grande partie du carbone de la cellulose détruite ; il se forme également, en quantité beaucoup moins grande et surtout très variable, de l'alcool éthylique, parfois des acides fixes, toujours des gaz, très variables également : H, CO₂, CH₄, H.

Naturellement, le métabolisme d'une souche n'est relativement fixe que dans des conditions de culture bien définies ; la proportion d'alcool formée, en particulier, est fonction du degré d'aération de la culture et de sa température ; les proportions des divers acides volatils peuvent être très différentes si l'on modifie le pH de la culture. Nous avons étudié spécialement ce qui paraissait le plus constant dans le métabolisme d'une espèce donnée, à savoir la nature des acides gras volatils. Il nous est apparu que, pour chaque espèce, la proportion des divers acides pouvait varier, mais que leur nature était fixe. C'est ainsi que l'ensemble des souches précédemment décrites, aussi bien que celles isolées par nous, peuvent être rangées, à ce point de vue, en deux grandes séries :

celles dont le métabolisme de fermentation donne des acides acétique et butyrique et celles qui donnent les acides acétique et formique. L'intérêt de la question ne réside d'ailleurs pas seulement dans cette opposition qui, quoique réelle, pourrait n'être qu'un caractère secondaire, mais surtout dans le fait que les souches des deux séries présentent par ailleurs des caractères biologiques et évolutifs assez différents. Les différences de métabolisme biochimique, et plus particulièrement la nature des acides volatils formés, deviennent ainsi un test très simple de classification et de distinction de deux grands groupements physiologiques.

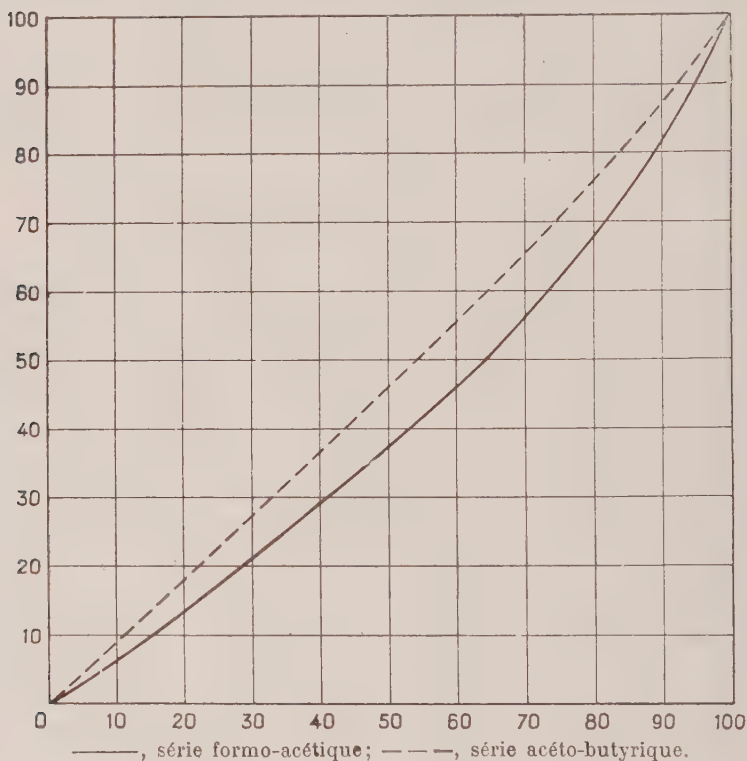
A. SÉRIE ACÉTO-BUTYRIQUE. — Le plus grand nombre des espèces décrites peuvent être rangées dans cette série. Elles appartiennent toutes au sous-ordre des Plectridiales : *Cad. cellulosae hydrogenicus* et *methanicus*, *Cad. cellulosolvens*, *T. thermocellus*, *T. cellulosam fermentans* ; il faut y ajouter des germes innominés, décrits par Sarles, Fred et Peterson, par Lymn et Langwell, par Snieszko, par Tetrault et Weiss.

De cette première énumération, il est facile de constater que la série contient à la fois des germes parasites et des germes libres ; des thermophiles et des germes cultivables entre 24° et 38°. Nous avons isolé, dans cette série, parmi les formes libres, *Pl. spumarum* et, parmi les formes parasites, quatre germes des matières fécales humaines, trois germes de celles de cobaye et deux germes de larves xylophages d'insectes.

La proportion des acides formés est très variable suivant les souches, allant de l'acide acétique presque pur (1 mol. d'acide butyrique pour 10 d'acide acétique) à un mélange de 1 mol. d'acide butyrique pour 4 d'acide acétique.

Les caractères biologiques, associés aux caractères du métabolisme biochimique qui définissent cette série, sont au nombre de deux : d'une part, ce sont des anaérobies stricts ; jamais la cellulolyse ne peut être réalisée en aérobiose ; d'autre part, ce sont des cellulophages obligatoires ; jamais ils ne font fermenter d'autres glucides que la cellulose, exception faite pour *T. thermocellus* dont la pureté a justement été mise en doute.

B. SÉRIE FORMO-ACÉTIQUE. — Le nombre de germes décrits dans cette série est très restreint. Nous avons isolé en 1933, de la panse des Ruminants, *Pl. cellulolyticum*. En 1935, V. Meyer isolait un germe à peu près identique. Pringsheim et Werckman et Stritar signalent, dans leurs bilans de fer-



mentation, des mélanges formo-acétiques, sans donner d'autres précisions sur les souches étudiées.

Les caractères associés des deux souches nettement individualisées jusqu'à ce jour, sont parfaitement concordants et peuvent être opposés à ceux de la série acéto-butyrique : ce sont des anaérobies facultatifs qui peuvent, dans certaines conditions, être cellulolytiques en présence d'oxygène libre et ils font fermenter un certain nombre de glucides autres que la cellulose ; nous avons étudié des hexoses, glucose, lévulose, galactose ; des pentoses, xylose et arabinose ; un hexobiose,

saccharose ; deux alcools, mannitol et glycérol ; seul ce dernier n'est pas fermenté.

Voici, à titre d'exemple (p. 66), les courbes de distillation, suivant la méthode de Duclaux, pour un germe de chaque série.

Pour résumer ce chapitre, on peut noter que ces groupements physiologiques ne se superposent ni à la taxonomie ni à un genre de vie (parasitisme ou vie libre), mais coïncident au contraire avec le potentiel d'oxydo-réduction des germes et avec leur pouvoir fermentaire ; il s'agit de groupements métaboliques.

LES PHÉNOMÈNES D'ÉVOLUTION

CHEZ LES BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES ANAÉROBIES.

Une des principales difficultés rencontrées dans l'étude des bactéries cellulolytiques est en rapport avec l'impossibilité fréquente de donner une description précise de souches qui paraissent instables tant du point de vue de leur morphologie que de leurs caractères biologiques ; presque tous les auteurs sont d'accord sur ce point.

Toutes les souches que nous avons étudiées ont été suivies au laboratoire pendant des périodes variant de un à quatre ans. Pendant ce temps, les souches ont été repiquées continuellement, en série linéaire et continue ; nous étions ainsi dans les meilleures conditions pour provoquer et suivre les phénomènes d'évolution.

Celle-ci est d'ailleurs complexe : d'une part, nous avons suivi des souches parasites et nous avons pu constater la perte plus ou moins progressive des caractères adaptatifs à la vie parasitaire ; d'autre part, nous avons pu constater, aussi bien chez les souches parasites que chez les souches libres, la perte progressive ou brusque du pouvoir cellulolytique. En réalité, les deux phénomènes sont souvent connexes et ce n'est que pour la clarté de l'exposition que nous les décrirons séparément.

Il faut, dès maintenant, signaler que nous n'attribuons pas au mot « évolution » le sens précis qu'il a en biologie pour les êtres eucaryotes et sexués, non plus qu'au terme de « mutation » ; dans l'un et l'autre cas, il ne s'agira que de varia-

tions progressives ou brusques des caractères biologiques des germes étudiés. Ces variations peuvent se faire dans le sens d'une « perte de fonction » ou dans celui d'une « récupération de fonction », ceci pour éliminer d'emblée toutes les discussions relatives au support morphologique des caractères héréditaires impliquant l'impossibilité d'une « acquisition de fonction nouvelle ».

A. PERTE DES CARACTÈRES ADAPTATIFS A LA VIE PARASITAIRE.

— C'est le passage du parasitisme à la vie libre. Nous avons déjà signalé les caractères adaptatifs à la vie parasitaire, que les souches isolées dans la nature présentent à des degrés divers ; rappelons qu'il s'agit essentiellement : a) de la nécessité d'un extrait ou facteur de croissance pour que la cellulolyse se produise ; b) de la nécessité de ce même extrait pour la prolifération même des germes (sans cellulolyse) ; c) du pouvoir chromogène.

Il ne s'agira ici que des phénomènes d'évolution observés *in vitro* au cours des passages. Ces phénomènes sont différents dans la série acéto-butyrique et formo-acétique.

I. *Série acéto-butyrique*. — Le premier terme de cette évolution peut être la perte de la spécificité rigoureuse du facteur de croissance : un germe isolé de la panse de chevreuil qui, primitivement, ne peut être cultivé qu'en présence de l'extrait de cette même panse, peut secondairement être cultivé dans de l'extrait de panse de bœuf.

Le deuxième terme est la perte même de la nécessité d'un extrait. Cette évolution peut se faire plus ou moins rapidement, entre le septième ou quinzième repiquage. Il est d'ailleurs inconstant et se voit surtout chez les souches qui présentent les caractères adaptatifs les moins accentués au départ. Chez les souches les moins adaptées (isolées du tube digestif des larves xylophages), elle est très rapide. Nous avons essayé, sur des souches très adaptées, chez lesquelles elle ne se produisait pas spontanément, de la provoquer par « entraînement » des germes à pousser dans des milieux de plus en plus pauvres en extrait ; ces essais ont été le plus souvent infructueux : le délai de cellulolyse s'allongeait considérablement (un mois) en même temps que le pigment

devenait de plus en plus pâle ; finalement, au-dessous d'un certain taux en extrait, la cellulolyse ne se produisait plus.

Il est à remarquer que, pour toutes les souches (fait déjà signalé par Y. Khouvine), les premiers ensemencements, alors que la culture est encore mixte, peuvent être faits sans extrait, les germes associés se chargeant d'amener les peptones au degré de dégradation voulu ; la nécessité apparaît alors que la culture se purifie. On peut noter parallèlement que le pigment n'apparaît parfois qu'au quatrième ou cinquième repiquage, quand la souche se purifie.

II. *Série formo-acétique*. — L'évolution vers la perte des caractères adaptatifs est assez différente et va très rapidement beaucoup plus loin. Après un petit nombre de repiquages, les extraits peuvent être supprimés et la cellulolyse se maintient, comme pour la série acéto-butyrique, dans un milieu contenant des peptones (à 1/4.000) ; puis l'azote aminé peut être supprimé et remplacé par de l'azote ammoniacal ; nos essais ont été infructueux quand nous avons essayé d'utiliser un milieu contenant seulement de l'azote nitrique.

B. PERTE DE LA FONCTION CELLULOLYTIQUE. — Il s'agit là d'une question complexe, car elle est liée à l'idée que l'on se fait de la pureté des souches : il est d'observation courante, et le fait a été signalé par presque tous les auteurs, que les germes cellulolytiques, passés par les milieux banaux sans cellulose (quand la culture est possible), perdent leur pouvoir cellulolytique et que, repiqués ultérieurement dans un milieu à cellulose, ils laissent celle-ci inattaquée ; on conçoit que le fait puisse être interprété de la façon suivante : ce qui a poussé sur les milieux banaux était un contaminant. Cette question sera traitée dans le chapitre suivant ; nous rapporterons seulement ici nos observations sur un certain nombre de souches suivies très longuement au laboratoire.

I. *Série acéto-butyrique*. — Les souches typiques correspondent à la description suivante : la cellulolyse ne se produit qu'en anaérobiose ; elle détermine un rH très bas (inférieur à 3,5) allant jusqu'à la réduction du rouge neutre ; repiquée sur milieux banaux (gélose Veillon profonde), la culture a l'aspect de l'anaérobiose stricte et s'accompagne de la réduc-

tion du rouge neutre ; en milieu liquide (tubes désaérés et scellés sous vide), les glucides ne sont pas fermentés : la gélatine est liquéfiée ; il y a formation d'indol (2).

Les souches atypiques répondent au contraire au schéma suivant : la cellulolyse ne se produit qu'en anaérobiose avec réduction du rouge neutre ; les ensemencements sur milieux banaux permettent d'isoler deux types de germes : l'un correspond à la description ci-dessus, l'autre à la description suivante : anaérobiose facultative, pas de réduction du rouge neutre, gélatine inconstamment liquéfiée, pas de formation d'indol, fermentation rapide d'un grand nombre de glucides.

Nous pensons avoir démontré que ce deuxième type de germes dérive du premier par filiation, avec perte du pouvoir cellulolytique. L'exposé sera simplifié en donnant le détail de l'étude d'une souche :

La souche « A » a été isolée de matières fécales humaines. Le premier ensemencement a été fait sur milieu à l'extrait fécal de Khouvine. Le pigment jaune apparaît au cinquième repiquage, deux mois après. A ce moment la culture présente, sur lame, un aspect de pureté. La cellulolyse s'accompagne de réduction du rouge neutre. Les subcultures sur milieux banaux donnent deux types de germes correspondant aux schémas suivants :

Schéma I.

Anaérobiose stricte, réduction du rouge neutre, formation d'indol, glucides non fermentés.

Schéma II.

Anaérobiose facultative, rouge neutre non réduit, pas de formation d'indol, glucides fermentés.

Après dix repiquages (deux ans), la cellulolyse se produit toujours dans les mêmes conditions, mais les cultures sur milieux banaux ne donnent plus que des germes du schéma I. Les caractères sont donc devenus ceux d'une souche typique de la série acéto-butyrique. Les repiquages en série linéaire sont continués. Six mois après, on assiste à une modification progressive de la souche. Les cultures sur milieux banaux donnent deux types de germes : des germes du schéma I et des germes correspondant à la description suivante :

Schéma III.

Microaérophilie (3), réduction lente et incomplète du rouge neutre, formation d'indol, fermentation lente de quelques glucides.

(2) L'indol est recherché dans une culture âgée de dix jours, en eau peptonée à 4 p. 100 (peptone Chapoteaut).

(3) Les colonies, en gélose profonde, remontent très près de la surface ; la culture est possible en milieu liquide, sans désaérer ni sceller, à condition que la hauteur du liquide soit suffisante ; pas de culture sur gélose inclinée.

Les repiquages en série linéaire sont encore continués et finalement on retrouve sur les milieux banaux des germes du schéma II.

On peut constater que le schéma III constitue un stade intermédiaire entre les schémas I et II et que la filiation a été suivie directement : l'évolution consiste en une diminution progressive du pouvoir réducteur (élévation du rH) et du pouvoir indologène, coïncidant avec un pouvoir glucidolytique croissant. Compte tenu de ces considérations, l'histoire de la souche « A » peut être résumée ainsi : souche cellulolytique anaérobie constituée primitivement par un mélange de germes cellulolytiques anaérobies et de germes glucidolytiques anaérobies facultatifs ; ces derniers s'éliminent ensuite spontanément, puis réapparaissent des germes qui *reprennent progressivement des caractères d'anaérobiose facultative et de glucidolyse étendue*. Nous pensons qu'il s'agit d'une variation de la souche avec apparition de mutants ayant perdu leur pouvoir cellulolytique.

La même évolution a été notée pour la souche « S », également isolée de matières fécales humaines. Cependant, les faits observés au cours de l'histoire de la plupart des souches sont loin d'être toujours aussi démonstratifs. L'évolution est incomplète et le cycle ne se ferme pas ; on conçoit que leur interprétation serait ardue, sinon impossible, si les fragments de cycles observés ne pouvaient être insérés comparativement dans un cycle complet déjà connu.

Voici quelques-uns de ces cycles évolutifs fragmentaires :

« C.AK ». Souche suivie trois ans. Apparition de pigment au troisième repiquage. Au stade de pureté, la souche est constituée par un mélange de cellulolytiques anaérobies stricts, indologènes, réduisant le rouge neutre, non glucidolytiques (schéma I) et de germes anaérobies facultatifs, non indologènes, ne réduisant pas le rouge neutre, glucidolytiques (schéma II). Ceux-ci s'éliminent. Secondairement réapparaissent des germes microaérophiles, réduisant faiblement le rouge neutre, indologènes, faisant fermenter lentement quelques glucides (schéma III). Le cycle n'a pas été complet, car le schéma II n'est pas réapparu jusqu'à ce jour.

Même évolution pour les souches *Pl. spumarum* et 2 souches isolées de larves xylophages d'insectes.

« C.AP ». Souche suivie pendant trois ans, isolée de fèces de cobaye.

Constituée pendant deux ans de germes du schéma I et II ; puis les germes du schéma II s'éliminent. Pendant un an, jusqu'à ce jour, la souche reste stable, constituée uniquement de germes du schéma I.

Avant de terminer l'étude de ces phénomènes évolutifs chez les acéto-butyriques, il faut remarquer que certaines souches, telle *Cad. cellulosa dissolvens*, qui ne peuvent pas être cultivées sur les milieux banaux, sans extrait fécal et sans cellulose, apparaissent douées d'une fixité remarquable ; nous avons déjà signalé l'impossibilité à laquelle nous nous étions heurtés de lui faire perdre ses caractères adaptatifs à la vie parasitaire. En réalité, cette fixité est plus apparente que réelle et Khouvine signale que ce germe, après un très grand nombre de repiquages sur milieu à l'extrait fécal, a pu être transporté sur milieux usuels additionnés de cellulose et y produire une cellulolyse de plus en plus lente lors des subcultures, avec disparition progressive du pigment jaune. Il s'agit donc d'une différence quantitative plus que d'une opposition fondamentale avec les faits que nous avons observés et rapportés ici.

II. *Série formo-acétique*. — Les phénomènes évolutifs sont complètement différents. Les deux souches actuellement connues de cette série ont des caractères remarquablement concordants au point de vue qui nous occupe : dans les deux cas, les souches se montrent constituées, lors des repiquages sur milieux usuels, uniquement par des germes du schéma II. Tous nos essais de dissociation, pour retrouver des germes du schéma I, ont été infructueux et force nous est de considérer les souches de cette série, même sous leur forme typique, comme douées d'un pouvoir glucidolytique étendu. En réalité, il est probable qu'il s'agit d'une transformation immédiate, dès le premier repiquage sur milieux usuels, des germes cellulolytiques en germes glucidolytiques à faible potentiel d'oxydo-réduction et à pouvoir indologène nul.

Le point de vue de l'évolution des souches, donc, comme bien d'autres, va à l'appui de nos conclusions qui tendent à opposer de façon fondamentale les séries acéto-butyrique et formo-acétique.

ESSAIS D'INTERPRÉTATION DES FAITS RELATIFS
A LA PURETÉ DES SOUCHES.

Trois exemples montreront comment se pose le problème :

Werner isole de l'intestin de *Potosia cuprea* un cellulolytique anaérobie (d'ailleurs non étudié au point de vue de son métabolisme) ; il est « Gram-négatif », à spore terminale ovale et cils péritriches ; il peut être cultivé sur cellulose-agar et ne fait fermenter aucun glucide autre que la cellulose. Cependant Werner trouve simultanément un germe identique au point de vue morphologique, anaérobie facultatif, faisant fermenter les glucides, ne réduisant pas le rouge neutre et ne liquéfiant pas la gélatine. Il ne discute pas les rapports entre les deux germes et signale ce second comme un germe associé.

Snieszko isole un thermophile, anaérobie strict ; mais il remarque dans les cultures la présence de germes légèrement différents au point de vue morphologique (dimensions des spores et des bâtonnets). Il pense reconnaître trois types de germes dans cette culture mixte ; parmi ces trois types, il parvient à en isoler deux sur les milieux usuels. Le type A est un anaérobie facultatif, fermentant les glucides, non indologène ; le type B est d'abord anaérobie, puis anaérobie facultatif, il fait fermenter les glucides. Aucun de ces deux types, isolé par cette technique, n'est cellulolytique ; seule la culture mixte, à trois types, est cellulolytique. Snieszko prend partie et dit que le troisième type, qui n'a pu être isolé en culture pure, est le vrai cellulolytique et que les deux types A et B sont des contaminants.

Meyer isole un cellulolytique que nous avons classé dans la série formo-acétique. Avec ce germe, il isole un *Plectridium*, anaérobie facultatif, non cellulolytique, identique au cellulolytique. Il n'établit pas de rapport entre les deux germes.

Il est ainsi de règle presque constante de trouver dans les cultures de cellulolytiques, dites pures, des germes de morphologie presque identique, se différenciant seulement des cellulolytiques par leur anaérobiose facultative, leur pouvoir glucidolytique étendu et leur faible potentiel de réduction. La plupart des auteurs constatent cette juxtaposition sans y

attacher d'importance, d'autres parlent de contaminants qu'il est impossible d'éliminer.

Les faits que nous avons décrits au chapitre précédent, nous amènent à proposer une autre hypothèse : les germes anaérobies facultatifs morphologiquement identiques aux cellulolytiques anaérobies, seraient des mutants ayant perdu leur pouvoir cellulolytique. Nous exposerons d'abord les arguments qui plaident en faveur de cette hypothèse, puis ceux qui pourraient être invoqués contre.

Les arguments « pour » peuvent être ramenés à trois : il est d'abord frappant que les « contaminants », décrits par tous les auteurs, présentent les mêmes caractères, et cela pour des souches isolées de milieux très différents : il faudrait à tout le moins admettre entre les bacilles cellulolytiques et leurs contaminants un rapport étroit ; de plus, la morphologie de ces contaminants est justement identique à celle des cellulolytiques. Le deuxième argument paraît plus démonstratif : les faits rapportés par les auteurs sont identiques à ceux que nous avons constatés pour les souches C.AK et C.AP et, sans la connaissance de l'évolution de la souche A et de la souche S, nous aurions également conclu à la présence de contaminants ; mais le cycle évolutif complet de celles-ci nous a permis d'interpréter les cycles fragmentaires des premières : nous avons vu les cellulolytiques se transformer progressivement en germes à type de contaminants. Enfin, troisième argument : il y a un parallélisme très net entre le pouvoir cellulolytique et celui de réduire le rouge neutre ; or, nous avons vu baisser ce pouvoir réducteur, jusqu'à disparaître, en même temps qu'apparaissait le pouvoir glucidolytique qui caractérise les contaminants.

Mais, et c'est là un contre-argument dont on ne peut contester la valeur, on ne peut parler en rigueur de variation et de mutation que si l'on est parti d'une colonie unique et même d'un germe unique, car on peut toujours objecter qu'au départ il y avait mélange de germes et, ultérieurement, modification des proportions respectives de ces germes simulant la variation d'une seule espèce de germes. C'est pour répondre à cette objection que certains auteurs ont tenté la cellulolyse à partir d'un germe unique ; malheureusement, les résultats

ont été décevants : Tétrault utilise une culture dite pure de *T. thermocellus*. Par passage sur milieux solides à la cellulose et sur milieux liquides, il note la présence de formes sphériques, qui semblent coïncider avec l'acmé de la cellulolyse et des bâtonnets à spores terminales ; parfois, dans les cultures pigmentées, il note même la présence de formes aberrantes à type de zygomycètes. Il tente des cultures à partir d'un germe unique (144 essais) ; ces cultures ne poussent pas, sauf quatre fois, et la culture ainsi obtenue, un bâtonnet à spore terminale, n'est pas cellulolytique. Tétrault tente d'établir un rapport entre ces formes diverses trouvées dans une culture dite pure et pose, sans les résoudre, les trois alternatives suivantes : a) cycle d'un seul organisme ; b) changement de physiologie d'un seul organisme ; c) symbiose de deux ou plusieurs organismes.

C'est dire qu'il s'agit là de difficultés qui apparaissent actuellement insurmontables.

Il semble cependant que, sans avoir recouru à la technique du germe unique, nous soyons à même d'opposer un argument à l'objection d'une pseudo-variation par mélange de cultures : si les cultures du schéma III, qui présentent des caractères intermédiaires entre ceux du schéma I et du schéma II, étaient constituées par un mélange de germes de ces deux schémas, il serait possible de dissocier, sur milieux solides, cette culture en ses deux constituants. Or, il n'en est rien : chaque colonie en gélose profonde présente (lors de ses subcultures) les caractères du schéma III. C'est donc *chaque germe* qui présente ces caractères intermédiaires, et l'évolution apparaît alors comme ayant les caractères d'une filiation directe.

Il nous apparaît donc licite d'admettre, tout au moins en ce qui concerne les souches que nous avons étudiées, que nous avons travaillé sur des cultures pures ayant présenté des variations *réelles*.

CONCLUSIONS.

1° Les bactéries cellulolytiques constituent un groupement physiologique qui ne se superpose pas à un groupe systématique défini ; ce groupement est caractérisé par son activité métabolique : hydrolyse de la cellulose en anaérobiose fonc-

tionnelle, avec formation d'acides gras volatils. Les germes actuellement connus doués de cette propriété font tous partie de la famille des Plectridiales, mais sont répartis, au milieu de très nombreux autres germes non cellulolytiques, dans les sous-familles des *Terminosporaceae* (genre *Terminosporus* et *Caduceus*) et des *Plectridiaceae* (genre *Plectridium*).

2° Il nous est apparu qu'il y avait intérêt à diviser ce groupe en deux sous-groupes physiologiques définis à la fois par leur métabolisme et divers caractères associés : série acéto-butyrique et formo-acétique.

3° Les cellulolytiques anaérobies sont les uns parasites, les autres libres ; les souches parasites sont caractérisées par un certain nombre de propriétés qui traduisent leur adaptation au milieu intestinal plus ou moins complexe de l'hôte.

4° L'instabilité des souches est très fréquente. Si elles sont suivies assez longtemps au laboratoire avec repiquages ininterrompus, on peut constater une double évolution : d'une part, perte des caractères adaptatifs à la vie parasitaire (chez les souches parasites) et, d'autre part, apparition, dans les cultures, de germes perdant leur pouvoir cellulolytique.

5° La question de la pureté des souches est, dans l'état actuel de nos connaissances, encore irrésolue en rigueur ; cependant, nous croyons pouvoir admettre qu'un certain nombre de germes, généralement décrits comme contaminants, ne sont en réalité que des cellulolytiques en train de perdre, ou ayant perdu, leur pouvoir cellulolytique et apparaissant spontanément dans les cultures fréquemment repiquées dans les milieux de laboratoire. Le fait a, tout au moins, été constaté de façon certaine, dans les cultures que nous avons étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

- COOLHAS. *Zentralbl. Bakt.*, II, **76**, 1928, p. 344.
COWLES et RETTGER. *J. of Bact.*, **21**, 1931.
FRED, VILJOEN et PETERSON. *Abstracts Bact.*, **8**, 1924, p. 4.
KELLERMANN et Mc BETH. *Zentralbl. Bakt.*, **34**, 1912, p. 63.
KHOUVINE. *Ces Annales*, **37**, 1923, p. 711.
LYMN et LANGWELL. *J. Soc. Chem. Ind.*, 1923, p. 280.
MEYER (R.). *Arch. f. Mikrob.*, **5**, 1934, p. 185.
MEYER (V.). *Zentralbl. f. Bakt.*, II, **92**, 1935, p. 1.
OMELIANSKI. *Zentralbl. Bakt.*, II, **48**, 1902.

- POCHON. *Ces Annales*, **55**, 1935, p. 676 ; *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 1937, p. 870 ; **126**, 1937, p. 854 ; **127**, 1938, p. 997 ; *C. R. Acad. Sc.*, **202**, 1936, p. 1538 ; **203**, 1939 ; *Trav. Sta. Zol. Wimereux*, **13**, 1938, p. 575 ; *Rev. gén. Sc.*, **47**, 1936, p. 55.
- PRÉVOT. *Ces Annales*, **61**, 1938, p. 72.
- PRÉVOT et POCHON. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 966.
- FRINGSHEIM. *Z. Physiol. Chem.*, **78**, 1912, p. 268 ; *Zentralbl. Bakt.*, **II**, **38**, 1913, p. 513.
- SARLES, FRED et PETERSON. *Zentralbl. Bakt.*, **II**, **85**, 1932, p. 401.
- SNIESZKO. *Zentralbl. Bakt.*, **II**, **88**, 1933, p. 403.
- SNIESZKO et NORMA KIMBALL. *Zentralbl. Bakt.*, **II**, **88**, 1933, p. 293.
- TÉTRAULT. *Zentralbl. Bakt.*, **II**, **81**, 1930, p. 28.
- TÉTRAULT et WEISS. *J. of Bact.*, **37**, 1933, p. 95.
- WERNER. *Zentralbl. Bakt.*, **II**, **67**, 1926, p. 297.
- WERKMANN et STRITAR. *J. of Bact.*, **23**, 1932, p. 71.
- WINOGRADSKI. *Ces Annales*, 1929, p. 549.

RECHERCHES
SUR LE TYPE RESPIRATOIRE
DE L'ESPÈCE *CORYNEBACTERIUM PYOGENES* (1)

(var. *C. bovis*, B. de Poels, et var. *C. suis*, B. de Grips).

par F. SENTHILLE.

(Institut Pasteur, Service de M. Weinberg.)

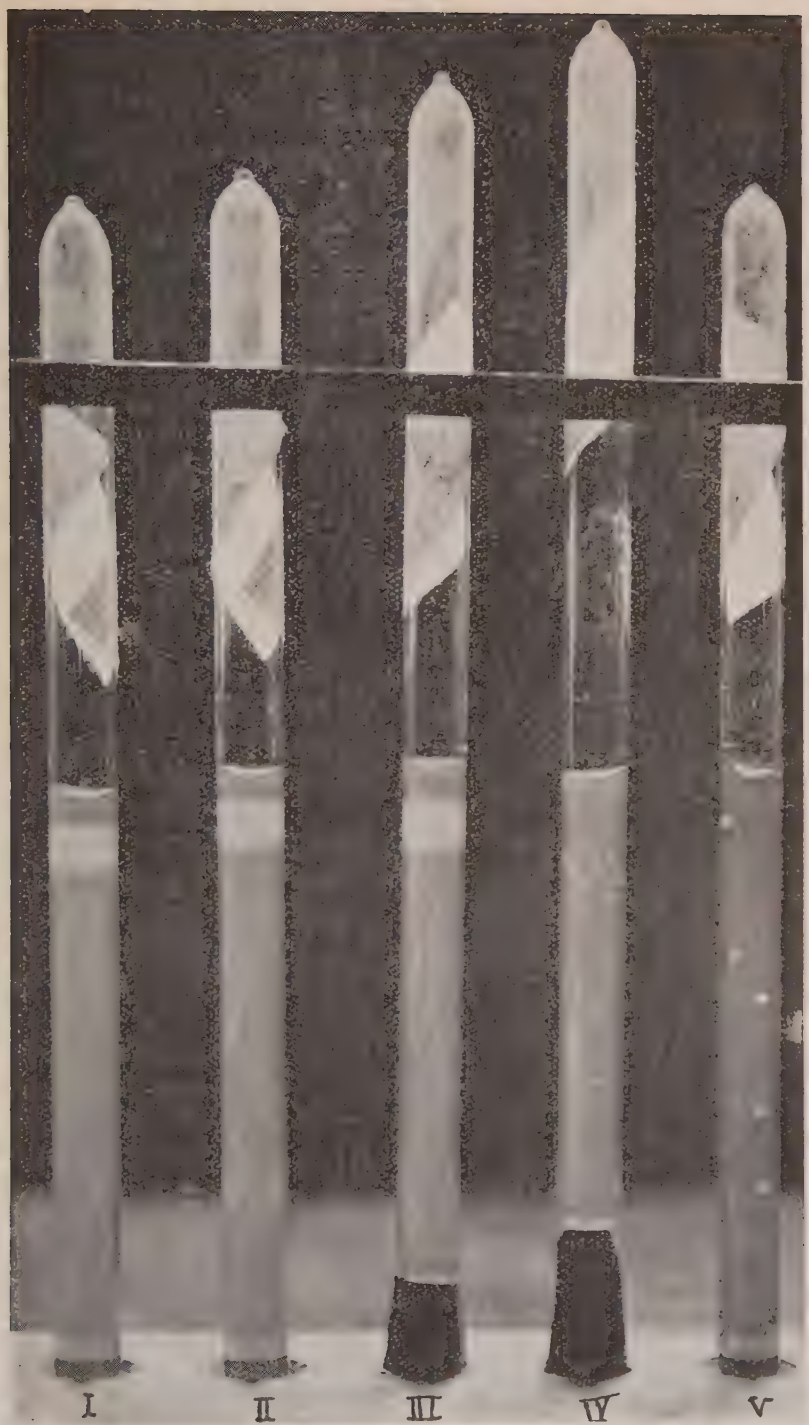
La récente épizootie de fièvre aphteuse a permis à M. Weinberg et ses collaborateurs [1] de montrer que les complications survenant au cours de cette maladie, complications que l'on avait primitivement assimilées à la gangrène gazeuse et contre lesquelles la sérothérapie antigangréneuse avait échoué, devaient en réalité être attribuées au bacille de Poels (*Corynebacterium pyogenes bovis*) seul ou associé à des cocci soit aérobies soit anaérobies.

Etudiant les échantillons de pus provenant de ces complications qui nous étaient envoyés par les vétérinaires praticiens, nous avons d'abord essayé l'isolement du B. de Poels sur sérum de cheval coagulé. Nous avons ensuite pensé que la méthode d'isolement en gélose profonde, couramment utilisée pour l'étude des microbes anaérobies, pourrait nous donner des résultats plus heureux. Le B. de Poels, est, en effet, considéré par les différents auteurs qui l'ont étudié, comme un anaérobie facultatif.

Nous avons doncensemencé l'une des souches (P, bovis) que nous possédions, en gélose au bouillon Vf (2) glucosé à 2/1.000. Dans certains tubes nous avons ajouté à la gélose 1/10 de son volume de sérum de cheval stérilisé par filtra-

(1) La rédaction de cet article était terminée au 25 août 1939. Il n'a pu être publié plus tôt en raison des événements survenus. Depuis lors, L. Balozet et P. Receveur [6] ont fait paraître une note dans laquelle ils confirment nos observations.

(2) Nous désignons sous ce nom le bouillon viande-foie, décrit par MM. Weinberg et Goy.



Cliche du a M. P. Jeantet.
chef du Service photographique de l'Institut Pasteur.

tion, car cette souche avait jusqu'alors été ensemencée en bouillon-sérum de cheval.

Les tubes IV et V de la figure permettent de se rendre compte des résultats obtenus. Dans les tubes de gélose non additionnée de sérum (IV) les colonies sont du volume d'une tête d'épingle, arrondies, à bords généralement irréguliers, opaques, de couleur blanchâtre. Elles sont disposées dans la profondeur du tube de la manière suivante : on ne trouve aucune colonie jusqu'à une profondeur de 9 millimètres environ. Dans la zone comprise entre 9 millimètres et 12 millimètres de la surface de la gélose, les colonies sont très nombreuses. Au-dessous de cette zone, les colonies sont moins nombreuses mais on en voit dans toute la profondeur du tube. Dans les tubes de gélose additionnée de sérum de cheval (V), les colonies sont plus grosses, du volume d'un grain de mil, lenticulaires, opaques, de couleur blanchâtre. Dans cette série de tubes nous n'avons trouvé aucune colonie située à une distance de la surface de la gélose inférieure à 8 millimètres.

Notre attention étant attirée par le fait que nous n'avions trouvé aucune colonie à moins de 8 millimètres de profondeur, nous avons pratiqué des ensemencements massifs dans une série de tubes de gélose non additionnée de sérum. Les résultats obtenus peuvent être observés sur les tubes I, II et III de la figure.

On peut voir sur la photographie de chacun des trois tubes une zone blanchâtre dont la limite supérieure se trouve située à 8 millimètres de la surface de la gélose, et la limite inférieure à 12 millimètres de ce même repère. Cette zone blanchâtre est due à la présence à ce niveau d'une multitude de colonies extrêmement petites, mais que l'on peut distinguer toutefois en examinant à la loupe la région supérieure ou inférieure qui borde les parties transparentes. Au-dessous de cette zone, on peut voir dans toute la profondeur du tube, un très grand nombre de petites colonies. Cependant, leur nombre est tel que la gélose demeure transparente. Au-dessus de la limite supérieure de la zone blanchâtre, on ne trouve aucune colonie. Cette zone blanchâtre représente donc une zone de *fertilité maxima*, et l'on peut considérer que le *B. de Poels*

se range dans le type respiratoire III décrit par Prévot [2] et par Weinberg, Nativelle et Prévot [3], et qu'il doit, de ce fait, être considéré non point comme un microbe anaérobie facultatif, mais comme une espèce microaérophile.

Nous avons voulu confirmer les résultats obtenus avec la souche P₁ par l'examen de 10 nouvelles souches de *C. pyogenes*. Parmi ces dernières, 9 étaient d'origine bovine (B. de Poels) et provenaient également du pus de complications pseudo-gangréneuses de fièvre aphteuse. La dixième était d'origine porcine (B. de Grips). Ces 10 souches nous ont donné, au cours de 3 épreuves successives, des résultats absolument semblables à ceux que nous avons exposés au sujet de la souche P₁.

*
* ❧

Afin de donner plus de précision à cette brève étude, nous avons entrepris de mesurer le potentiel d'oxydo-réduction de l'espèce *Corynebacterium pyogenes*. Nous avons employé la méthode des indicateurs colorés utilisée pour la première fois par Aubel et Aubertin [4] et dont Prévot [5] a donné récemment une étude technique approfondie. Nous avons fait usage du bleu de méthylène en solution aqueuse à 1/500 et à la dose de 0 c. c. 1 par tube de gélose (tubes de 8 millimètres × 180 millimètres, hauteur de la gélose 9 centimètres) Après quarante-huit heures de séjour à l'étuve, la limite inférieure de la zone colorée par le bleu de méthylène se trouve à 10 millimètres de la surface de la gélose.

Examinant les tubes ensemencés depuis quarante-huit heures avec les 11 souches précédemment étudiées et laissés à l'étuve à 38°, nous avons constaté que la zone de fertilité maxima représentée par un anneau opaque se situe à la partie inférieure de la zone colorée par le bleu de méthylène et qu'elle dépasse cette zone colorée de 2 millimètres environ, de telle sorte que l'on voit une mince zone opaque au-dessous de la zone bleue. En somme, ici encore la zone de fertilité maxima de *C. pyogenes* se trouve à une distance de la surface de la gélose comprise entre 8 millimètres et 12 millimètres.

Cette constatation vient confirmer les précédentes. C'est en

effet, d'après les auteurs précités, dans la zone située à 1 centimètre environ de la surface de la gélose, zone correspondant à la limite inférieure de coloration par le bleu de méthylène, c'est-à-dire à $rH = 14$ que les espèces microaérophiles présentent leur fertilité maxima.

En conclusion, l'espèce microbienne *Corynebacterium pyogenes* représentée par les variétés *C. bovis* (*B. de Poels*) et *C. suis* (*B. de Grips*) ne doit plus être classée parmi les microbes anaérobies facultatifs, mais plus exactement parmi les espèces microaérophiles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] a) WEINBERG (M.), FORGEOT (P.) et RICHART (A.). *Bull. Acad. Vét. France*, **41**, n° 4, 1938 ; b) WEINBERG (M.), FORGEOT (P.) et MERLE (A.). *Ibid.*, **41**, n° 9, 1938.
- [2] PRÉVOT (A.-R.). Etudes de systématique bactérienne. I. Lois générales. — II. Cocci anaérobies, p. 96. *Thèse Sciences Paris*, 1933, Masson, édit.
- [3] WEINBERG (M.), NATIVELLE (R.) et PRÉVOT (A.). *Les Microbes anaérobies*, Paris, 1937, p. 959, Masson, édit.
- [4] AUBEL et AUBERTIN. a) *C. R. Soc. Biol.*, **97**, 1927, p. 1729 ; b) *Ibid.*, **98**, 1928, p. 957.
- [5] PRÉVOT (A.-R.). a) *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 1489 ; b) *Bull. Soc. Philomathique de Paris*, **121**, 1938, p. 80-88.
- [6] BALOZET (L.) et RECEVEUR (P.). *Archives de l'I. P. de Tunis*, **29**, 1939, p. 316.

VARIATIONS DANS L'ARGYROPHILIE DES SPIROCHÈTES

par Y. MANOUÉLIAN.

(*Institut Pasteur.*)

L'examen direct au microscope ou mieux encore l'examen au fond noir, divers colorants, l'imprégnation à l'argent, le procédé à l'encre de Chine permettent de mettre en évidence les spirochètes en goutte pendante ou sur frottis. Mais quand on veut étudier ces microorganismes par la méthode des coupes, il est nécessaire de recourir à l'imprégnation à l'argent, car si l'on parvient à colorer quelques spirochètes par certaines couleurs basiques de l'aniline, il n'en est pas moins vrai que les résultats sont très inférieurs à ceux obtenus par l'argent. En outre, des spirochètes pathogènes importants, comme les parasites de la syphilis, de l'ictère hémorragique, pour ne citer que ces deux microorganismes, ne sont décelables dans les coupes que par l'argent. On a pu, grâce aux procédés d'imprégnation argentique, déceler les parasites spiralés dans les tissus, établir les rapports avec les éléments anatomiques, découvrir les formes parasitaires atypiques ainsi que les formes minuscules et le spirochètogène.

Les spirochètes présentent donc une affinité pour l'argent ; ils sont argyrophiles. Mais cette argyrophilie varie dans de larges limites. Ceux qui possèdent une certaine pratique savent en effet combien varie l'intensité de coloration de ces microorganismes : du noir ébène jusqu'au gris pâle. Cette différence dans l'argyrophilie doit retenir l'attention des chercheurs. Ce fut, il y a déjà quelques années, le sujet d'une conversation au cours d'une visite dont le professeur Bessemans nous a honoré. Nous avons estimé qu'il était intéressant de relater nos propres observations sur ce sujet.

*
* *

Nous affirmons donc qu'en général l'intensité de coloration varie notablement dans les préparations. Dans les frottis on

trouve, en effet, à côté de spirochètes fortement colorés, d'autres présentant une teinte moins foncée ; il existe même des spirochètes à peine imprégnés.

Dans les fragments de tissus convenablement traités par la méthode des coupes, rappelons qu'il existe une zone périphérique surimprégnée, une zone centrale insuffisamment imprégnée et une zone intermédiaire avec des spirochètes électivement colorés. Or, dans les coupes provenant de cette zone, à côté de spirochètes bien imprégnés de teinte noire, on peut en déceler d'autres moins intensément colorés, de teinte grise, et même des spirochètes très pâles. On trouve cependant des spirochètes de teinte pâle même dans la zone surimprégnée. Quant à la zone centrale, à côté d'un grand nombre de microorganismes grisâtres, pâles, on en surprend quelques-uns de teinte noire. L'argyrophilie des spirochètes varie donc, nous le répétons, dans de larges limites. Notons qu'il ne s'agit pas ici de formes parasitaires involutives, en dégénérescence, qui sont fortement argyrophiles, mais bien de spirochètes typiques.

Ces considérations générales s'appliquent aussi au spirochète de Schaudinn : dans une préparation contenant les spirochètes de la syphilis, ceux-ci, après l'imprégnation à l'argent offrent en effet des différences tinctoriales marquées ; leur teinte varie du noir foncé jusqu'au gris pâle ; les microorganismes sont en ce dernier cas peu visibles ; il faut beaucoup d'attention pour les déceler ; il existe aussi des spirochètes présentant des teintes intermédiaires. Nous pouvons en conclure que la substance argyrophile qui permet l'imprégnation à l'argent se trouve en quantité variable chez les spirochètes. Il est évident que si cette substance manquait, l'imprégnation n'étant plus possible, les parasites demeurés incolores n'auraient pu être décelés. Nous appelons l'attention des auteurs sur ces faits ; ils permettent d'expliquer la rareté, l'absence du *Spirochæta pallida* dans les pièces soumises à l'imprégnation argentique. Nous ne faisons point allusion ici aux formes parasitaires différentes des spirochètes typiques, formes qui se trouvent dans toutes les lésions syphilitiques, et présentent quant à l'argyrophilie les mêmes caractères que les spirochètes typiques, mais bien de ces spirochètes clas-

siques dont la présence permet le diagnostic de la syphilis. Il existe des tissus, des organes virulents où, dans les pièces soumises à l'imprégnation argentique, on ne parvient pas, malgré de nombreuses recherches, à déceler des parasites typiques. Parfois, dans une nouvelle pièce provenant de la même lésion, on surprend des spirochètes de teinte grise, d'autres gris pâle, enfin d'autres à la limite de la colorabilité ; encore un peu, ils auraient échappé à l'observation microscopique. Il peut exister, il existe des spirochètes non imprégnables par l'argent et partant indécélables par ces méthodes de recherches ; un tissu, un organe contenant de pareils parasites fourniraient à l'imprégnation des résultats négatifs ; l'absence de parasites peut donc n'être qu'apparente.

Nous pourrions citer nombre d'exemples corroborant ce que nous venons d'affirmer ; nous nous contenterons de rapporter des faits relatifs à la paralysie générale et à la syphilis placentaire, ainsi que nos observations sur le foie des cobayes dans l'infection expérimentale par le spirochète de l'ictère hémorragique.

Dans quelques cas de paralysie générale, l'étude de la substance grise du cortex cérébral révélait des formes parasitaires anormales bien imprégnées, de teinte noirâtre, alors que les spirochètes typiques semblaient absents de prime abord, mais un examen attentif nous montra un nombre considérable de spirochètes, types de Schaudinn, disposés surtout autour des capillaires sanguins ; une particularité cependant : presque tous, et, en certaines régions, tous les spirochètes typiques étaient teints en gris pâle, pouvant facilement échapper à l'observation. Au reste, il nous a semblé qu'il existait de nombreux spirochètes à la limite de la visibilité, et nous avons nettement l'impression qu'il y en avait encore qui, faute de coloration suffisante, demeuraient indécélables.

Nous venons d'envisager le cas de tissus riches en spirochètes. Parfois, les fragments de pièces de lésions syphilitiques contiennent peu de parasites, tous localisés dans certains foyers et partant difficilement décelables. Parfois aussi les microorganismes se montrent sous des aspects différents : peu de spirochètes typiques, un grand nombre de formes évo-

lutes, en dégénérescence, dont la plupart sont incorporés dans les phagocytes mobiles ou fixes.

Or, si, à côté de spirochètes typiques de teinte grise, peu argyrophiles, on peut surprendre quelques spirochètes colorés en noir, fortement argyrophiles, il n'en est pas moins vrai qu'un grand nombre de formes parasitaires anormales sont de beaucoup plus argyrophiles que les spirochètes typiques. La plupart de ces formes représentent des stades de la dégénérescence des parasites ; quand elles se trouvent à l'intérieur des phagocytes, le contraste est souvent frappant.

Un exemple nous est offert par l'étude des placentas syphilitiques. Dans nombre de ces organes il existe une phagocytose intense de spirochètes par les macrophages et les polynucléaires. Dans la syphilis humaine, c'est dans un certain nombre de placentas que nous avons constaté les plus remarquables exemples de phagocytose ; alors que les spirochètes typiques sont rares ou introuvables dans les veines, on constate un nombre prodigieux de spirochètes dans les phagocytes neutrophiles, éosinophiles, ainsi que dans les macrophages, les mononucléaires du sang. Quelques parasites phagocytés sont encore reconnaissables, mais la plupart sont à l'état de débris, de granulations. Or, les parasites incorporés sont pour la plupart fortement argyrophiles : quant aux spirochètes libres, ils présentent souvent une teinte plus claire, parfois même ils sont fort pâles, on ne peut les observer qu'avec peine. Le contraste est, avons-nous dit, frappant. Dans un certain nombre de cas, nous avons surpris des foyers où les spirochètes libres étaient à peine colorés, extrêmement pâles ; quelques-uns même étaient presque à la limite de la visibilité, et cependant, à côté de pareils spirochètes, on trouvait des phagocytes bourrés de parasites bien visibles, de teinte noire. Devant cette argyrophilie si peu accusée, nous inclinons à penser qu'il existe des spirochètes imprégnables et partant indécélables par les procédés à l'argent, procédés qui seuls peuvent être employés pour mettre en évidence ces parasites à l'aide de la méthode des coupes ; les recherches demeurent vaines, car il s'agit de spirochètes *argyrophobes*.

L'étude du foie dans la spirochètose ictéro-hémorragique nous fournit aussi un intéressant exemple : chez les cobayes

atteints de cette maladie, les spirochètes fourmillent dans le foie ; ils y sont souvent aussi nombreux que les spirochètes pâles dans le foie au cours de l'hérédosyphilis précoce. Mais, à l'encontre de ce que l'on observe avec le spirochète de Schaudinn, le spirochète d'Ido et d'Inada ne pénètre pas dans le cytoplasme des cellules hépatiques ; les parasites très nombreux, de teinte grise, forment un treillis *autour* des cellules. Dans les veines du foie, on constate une phagocytose intense des parasites par les leucocytes polynucléaires et les macrophages, et les spirochètes phagocytés se montrent souvent plus épais, de teinte plus *foncée, noire*. Notons qu'à côté de spirochètes typiques on trouve aussi des débris et des granulations d'origine parasitaire ; et comme parfois dans la syphilis, ici aussi on trouve dans les macrophages, en même temps que les parasites, des globules rouges et des débris de polynucléaires.

Dans les exemples précédents, nous avons relaté nos observations dans un certain nombre de cas où les spirochètes typiques se montraient peu argyrophiles ; il ne faudrait pas croire cependant qu'il en est ainsi dans tous les cas de paralysie générale, de syphilis placentaire ou d'ictère hémorragique, et qu'on n'y peut constater aucun spirochète fortement coloré par l'argent. Nous avons simplement rapporté nos observations, nous le répétons, *dans un certain* nombre de cas où les parasites se montraient peu argyrophiles, et c'est tout. Mais ces observations n'en sont pas moins intéressantes.

Les considérations que nous venons de développer se rapportent non seulement aux spirochètes typiques, mais aussi aux formes minuscules à un tour, à deux tours de spire, ainsi qu'aux spirochétogènes. Cette notion nous explique des faits qui ont jeté le désarroi parmi les chercheurs. Les spirochètes typiques à plusieurs tours de spire sont fort rares ou introuvables dans certains organes. Il s'agit là d'un fait résultant des recherches par les méthodes d'imprégnation argentique ainsi que par *toutes* les autres méthodes permettant l'observation au microscope des spirochètes. L'extrême rareté, l'absence de parasites dans des organes pourtant très virulents, a suggéré à des auteurs l'idée que les parasites s'y trouvent sous une forme infravisible, forme indémontrable par la tech-

nique actuelle. Or, si les spirochètes sont souvent pratiquement indécélables dans ces organes, nous y avons décelé des formes minuscules, des micro-spirochètes et des spirochètogènes. Mais comme on ne peut déceler ces formes que par l'imprégnation argentique et comme aussi leur argyrophilie varie, avons-nous dit, dans de larges limites, il arrive que parfois elles s'imprègnent mal ou ne s'imprègnent pas du tout. Voilà pourquoi, d'après nous, les formes parasitaires semblent parfois absentes dans les organes virulents.

Pour nous, dans l'évolution des spirochètes, il n'existe pas un stade où le parasite, soit par ses dimensions infimes, soit par ses caractères d'ordre physique ou chimique, échappe *toujours* à nos moyens de recherche et demeure *toujours* invisible. Un stade absolument infravisible, nous ne l'admettons pas. Ce sont les difficultés d'imprégnation, l'argyrophilie parfois fort peu accusée des formes parasitaires, des micro-spirochètes et des spirochètogènes qui rendent les recherches difficiles, impossibles même. Mais, devant un résultat négatif, loin de se décourager, il faut multiplier les recherches à l'aide des différents procédés d'imprégnation, et l'on finira souvent par déceler ces formes parasitaires.

Il est hors de doute pour nous qu'il existe chez les spirochètes de grandes différences quant à l'argyrophilie. Mais dans certaines circonstances il y a lieu de se demander si, indépendamment des spirochètes, d'autres conditions n'interviennent pas, rendant difficile, impossible même, l'imprégnation de ces organismes. En d'autres termes, si, outre les variations d'argyrophilie, propriété inhérente aux spirochètes constituant la cause *intrinsèque*, il y a lieu de se demander s'il n'existe pas des causes *extrinsèques* nuisibles aussi à l'imprégnation. Parmi celles-ci : les conditions physico-chimiques du milieu où se trouvent les spirochètes ; les substances produites dans les lésions, celles libérées dans l'autolyse, etc...

Notons aussi que la résistance du tréponème à l'imprégnation s'observe parfois dans les pièces ayant longtemps séjourné dans un fixateur. Le mélange de formol et d'eau distillée à 10 p. 100 est, on le sait, fort commode pour la fixation des pièces destinées à l'imprégnation argentique. Un séjour parfois fort prolongé des pièces dans le formol n'empêche point

la mise en évidence des parasites. Une fort longue expérience nous permet d'affirmer que des fragments d'organes syphilitiques conservés dans ce fixateur pendant dix, quinze ans, permettent d'obtenir des préparations très satisfaisantes. Les préparations de foie hérédosyphilitique ainsi obtenues sont, par exemple, fort démonstratives ; peut-être les tréponèmes ne sont pas colorés en noir aussi intense que dans les coupes imprégnées peu de temps après le prélèvement des fragments, mais ce n'est là qu'une nuance.

Il arrive cependant aussi que des fragments de lésions fort riches en spirochètes conservés dans le formol pendant un an, quinze mois, ne donnent aucun résultat après l'imprégnation à l'argent. Après ce que nous venons de dire il y a un instant, cette affirmation étonnera peut-être le lecteur. Mais son étonnement sera encore plus vif si nous disons que dans *certains cas* il s'agit, entre autres lésions, de syphilome expérimental du lapin. On imprègne facilement les spirochètes dans cette lésion ; or, *parfois*, après un séjour d'un an à quinze mois dans le formol à 10 p. 100, nous n'avons pu obtenir aucune imprégnation de ces microorganismes. Force nous est d'admettre que parfois certaines conditions encore inconnues rendent les spirochètes imperméables à l'argent.

Quoi qu'il en soit, il était intéressant, pensons-nous, de rappeler la variabilité chez les spirochètes quant à leur argyrophilie. Cette propriété de se colorer d'une façon plus ou moins intense, et parfois l'incolorabilité par l'argent, permettent d'expliquer les résultats négatifs dans les recherches (1).

Aussi, espérons-nous que les chercheurs avertis parviennent à perfectionner les méthodes d'investigation.

(1) Ces notions, pour être importantes, ne permettent cependant pas d'expliquer tous les échecs. Le nombre des microorganismes constitue aussi un facteur important. Il est évident que si les spirochètes se trouvent en nombre très réduit dans les tissus, il devient pratiquement fort difficile, impossible même de les y déceler.

RECHERCHE DU BISMUTH DANS LES CELLULES ET LES TISSUS ANIMAUX. FORMATION DE CRISTAUX CARACTÉRISTIQUES

par R. SAZERAC et J. POUZERGUES.

(*Institut Pasteur.*)

La mise en évidence de quantités extrêmement faibles de bismuth est devenue facile grâce aux nouvelles méthodes permettant d'apprécier, par formation de précipité ou par colorimétrie, des doses de métal qui peuvent être de l'ordre du millième de milligramme. A ce point de vue, la précipitation du bismuth par l'ortho-oxyquinoléine en présence d'iodure de potassium (1) nous semble particulièrement recommandable, car elle présente l'avantage de donner des cristaux caractéristiques, et, en vue de l'exposition du présent travail où nous l'avons utilisée de préférence, nous devons en rappeler les principes essentiels.

Cette réaction, due à la formation d'iodure double de Bi et d'ortho-oxyquinoléine, a lieu en milieu nitrique assez faible (de 4 à 5 p. 100). Elle est tout à fait nette jusqu'à la teneur en bismuth de 1 p. 1.000.000. Le précipité qui se forme, coloré en rouge orangé, est constitué en général par des faisceaux de petits prismes groupés autour d'un même centre et dont la disposition rappelle la forme cristalline de certaines osazones. D'après leur mode d'arrangement, ils représentent des houppes ou des faisceaux divergents à branches tantôt fines et flexueuses, tantôt épaisses et rigides, suivant la plus ou moins grande acidité du milieu qui les renferme. Ils sont d'autant plus réguliers et plus purs qu'ils proviennent d'une solution plus diluée. En effet, quand la concentration en bis-

(1) SAZERAC (R.) et POUZERGUES (J.). *C. R. Soc. Biol.*, **109**, 1932, p. 79 et 370.

muth est supérieure à 1 p. 100.000, les cristaux sont englobés dans une gangue de précipité amorphe et filamenteux ; mais il est facile de les faire apparaître, même dans les précipités volumineux obtenus à partir des solutions bismuthiques de titre élevé, à condition d'avoir opéré avec des liquides dont la teneur en acide nitrique ne dépasse pas 1 p. 100, pour éviter la formation de cristaux aberrants. Dans ces conditions, il suffit de chauffer une trace du précipité en suspension dans l'eau-mère dont il provient. On place sur une lame de verre quelques gouttes du mélange et on recouvre avec une lamelle. On chauffe sur veilleuse jusqu'à légère ébullition et on s'arrête lorsque le précipité a presque entièrement disparu par dissolution. On laisse refroidir et on examine au microscope.

Il est utile de rappeler que l'iodure double de Bi et d'ortho-oxyquinoléine est soluble dans plusieurs solvants organiques et notamment dans la cyclohexanone, laquelle, étant insoluble dans l'eau, peut permettre la séparation totale du précipité coloré et faciliter considérablement le dosage par colorimétrie.

En vue d'appliquer la méthode en question à la recherche du bismuth qui peut être inclus, à la suite d'injections, dans les cellules ou les tissus animaux, nous avons d'abord étudié le cas, particulièrement explicite, de la fixation de cet élément par les phagocytes du liquide péritonéal. On sait, d'après les données de Sazerac et Vaurs (2), que l'injection dans le péritoine d'une suspension aqueuse de bismuth à l'état de division extrême provoque un afflux de leucocytes dans lesquels on peut distinguer, au bout de peu de temps, des granulations du métal englobé. Pour pratiquer la réaction, on étale, sur une lame bien dégraissée, une goutte du liquide retiré par ponction du péritoine. Sur la préparation séchée et fixée par la chaleur, on dépose une goutte du réactif suivant, préparé extemporanément :

Solution de sulfate d'ortho-oxyquinoléine à 2 p. 100. 1 cent. cube.
Solution d'iodure de potassium à 4 p. 100 1 cent. cube.
Solution d'acide nitrique à 3 p. 100 8 cent. cubes.

2) SAZERAC (R.) et VAURS (R.). *Ces Annales*, 39, p. 86.

On recouvre avec une lamelle. La préparation est aussitôt lutée à la paraffine ou avec le lut, moins perméable, de Dunoyer.

Dans ces conditions, les phagocytes apparaissent légèrement colorés en jaune. Les grains de bismuth tranchent par leur vive coloration rouge orangé. Leurs contours sont particulièrement nets. Lorsqu'on s'est placé dans des conditions favorables, en pratiquant la ponction une demi-heure au

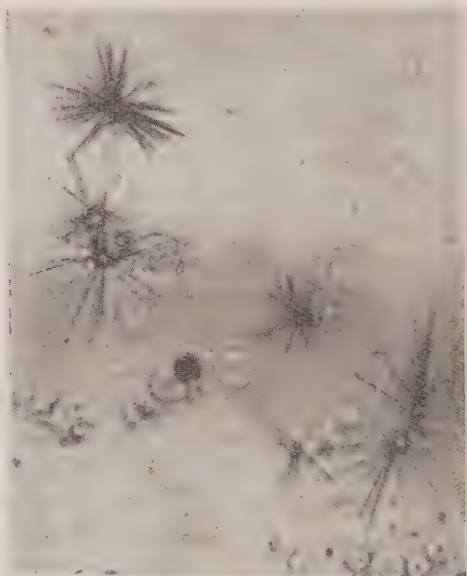


FIG. 1. — Formation de cristaux dans les leucocytes.

moins après l'injection, on constate que tous les grains de bismuth sont intracellulaires, et cette situation constante exclut l'idée d'une superposition fortuite. Le fond de la préparation est à peine teinté en jaune et il ne se produit aucune réaction dans le liquide, pouvant donner à penser qu'une quantité appréciable de métal s'est dissoute dans les humeurs. Mais la préparation abandonnée à elle-même présente au bout de quelques jours (en général huit à quinze jours) des modifications intéressantes. Les grains de bismuth précédemment repérés deviennent le centre de cristallisations qui se consti-

tuent peu à peu. Des rayons tantôt filamenteux et flexueux, tantôt épais et rigides, semblent progressivement sortir de chaque grain et peuvent atteindre finalement 50 fois les dimensions du grain initial et 10 fois la taille du phagocyte. Ces aiguilles, de couleur rouge orangé, se groupent généralement de façon à reproduire des figures semblables aux cristaux formés par le réactif dans les solutions bismuthiques faibles.

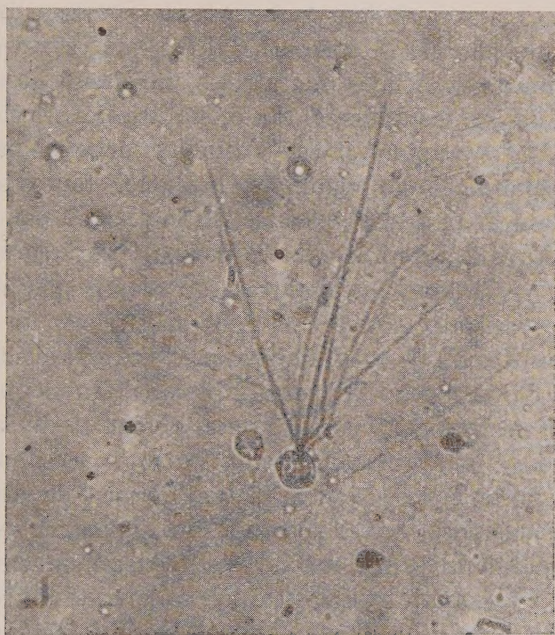


FIG. 2. — Autre type de formation de cristaux dans les leucocytes.

Elles se différencient facilement des aiguilles rouges ou violettes qui peuvent prendre naissance sur les bords de la lamelle et qui résultent de l'évaporation du réactif à travers la paraffine.

On obtient des résultats identiques en traitant de la même manière le suc musculaire recueilli au point d'injection d'une suspension de bismuth métallique dans l'eau glucosée. Les leucocytes, très nombreux, sont bourrés de grains de métal qui servent de point de départ à des cristallisations étendues.

Ces cristallisations peuvent également s'obtenir sur des coupes de tissus après injection de suspensions de dérivés bismuthiques : les tissus à examiner sont fixés dans le formol, puis inclus dans la paraffine et coupés suivant les techniques ordinaires. Sur la coupe débarrassée de sa paraffine et collée sur une lame bien dégraissée, on laisse tomber une goutte de réactif, on recouvre d'une lamelle, on lute comme précédemment. Le foyer d'injection apparaît comme une masse bien délimitée, rouge orangé, dans laquelle les leucocytes s'infiltrent, plus ou moins chargés de bismuth ; il est intéressant de noter que de nombreuses cellules migratrices entraînent hors du lieu d'injection des grains de métal. La cristallisation survient dans ces cas de façon rapide. Il est d'ailleurs facile de la rendre presque instantanée en chauffant la lame, toute préparée, à 80° pendant deux à trois minutes, en la plaçant par exemple dans une étuve à paraffine. Le lut qui entoure la préparation empêche, en s'étalant, l'évaporation du réactif. Par refroidissement, des cristaux s'amorcent ; ils donneront, au bout de vingt-quatre heures de magnifiques arborisations centrées par les grains de bismuth. Toutefois, certains grains particulièrement fins ne résistent pas à ce traitement et disparaissent au cours du chauffage, tandis que quelques cristaux apparaissent dans le liquide, témoignant d'un peu de dissolution du métal à chaud ; cette disparition de grains ne se produit jamais à froid dans les circonstances précédemment envisagées.

Les sels de bismuth solubles (bismuthotartrate de Na, phosphate de Bi, citrate de Bi ammoniacal, etc.) injectés en solution aqueuse dans le péritoine sont fixés rapidement par les phagocytes et la formation de cristaux dans les cellules, après traitement par le réactif (KI + oxyquinoléine) se produit plus rapidement que dans le cas de bismuth insoluble. Il suffit de quelques heures pour obtenir, à froid, de belles cristallisations.

Il n'en va plus tout à fait de même lorsque la solution bismuthique est injectée dans certains tissus, le muscle par exemple. La réaction, pratiquée dans les mêmes conditions que ci-dessus, garde tout son intérêt pour une recherche immédiate du métal : c'est ainsi que l'examen du point d'injection montre un foyer bien délimité, de couleur jaune orangé, tandis que quelques fibres musculaires se teignent de façon plus ou

moins nette, témoignant d'une imprégnation diffuse par le bismuth. Il est intéressant de noter que les phagocytes qui affluent autour de l'amas sont, comme dans le cas des injections de composés insolubles, chargés de grains bismuthiques à contours bien délimités. Mais les préparations ainsi obtenues sont généralement assez fugaces. En vingt-quatre à quarante-huit heures, toutes les granulations fines disparaissent et ce n'est que dans le cas d'un foyer important existant dans la préparation que l'on peut espérer voir des granulations persister et évoluer vers la cristallisation.

C'est encore ce qui se passe lorsqu'on traite par le réactif la coupe histologique d'un organe quelconque (notamment foie, rein ou rate) pour y rechercher le bismuth. La coloration immédiate en présence du réactif permet de retrouver facilement le métal dans les cellules. Nous avons pu ainsi retrouver le bismuth dans la lumière et dans les cellules bordantes des tubes contournés du rein après injection intraveineuse de sels bismuthiques chez le lapin : dès la troisième minute après l'injection, la réaction est positive et l'on retrouve des cellules chargées d'enclaves bismuthiques. La réaction devient par contre négative lorsqu'on examine les reins d'animaux sacrifiés dix minutes ou plus après l'injection. Dans le foie et la rate, au contraire, on peut caractériser dans les mêmes circonstances des grains bismuthiques jusqu'à vingt-quatre heures après l'injection. Mais les colorations obtenues sont fugaces et disparaissent généralement dans le délai d'un à deux jours.

En résumé, la mise en évidence du bismuth dans les cellules et les tissus animaux peut être réalisée d'une façon particulièrement nette, grâce à l'emploi du réactif à l'orthoxyquinoline. Pour provoquer avec plus de certitude la formation du complexe coloré ou des cristaux caractéristiques, il convient de tenir compte des conditions appropriées aux différents cas qui peuvent se présenter suivant la nature des organes examinés et des produits bismuthiques solubles ou insolubles, utilisés pour l'injection.

Le Gérant : G. MASSON.

